

Aus dem Klinisch-Chemischen Labor (Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine)
der Universitäts-Nervenlinik Marburg/Lahn
(Komm. Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

**DIE BIOSYNTHESE VON CHONDROITINSULFATPROTEIN
IM KÄLBERRIPPENKNORPEL.
ISOLIERUNG UND TEILWEISE CHARAKTERISIERUNG
DREIER LÖSLICHER UND EINES UNLÖSLICHEN
STRUKTURGEBUNDENEN „PRIMER“-POOLS.**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereiches Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
JOACHIM WUNSCH
aus Wolfsburg

Marburg 1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552328_0080

Aus dem Klinisch-Chemischen Labor (Leiter: Prof.Dr. T.O.Kleine)
der Universitäts-Nervenlinik Marburg/Lahn
(Komm. Direktor: Prof.Dr. H.Solcher)

e Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Kälberrippenknorpel.
Isolierung und teilweise Charakterisierung dreier löslicher und
eines unlöslichen strukturgebundenen "Primer"-Pools.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereiches Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

JOACHIM WUNSCH

aus Wolfsburg

Marburg 1976

Diese Untersuchung wurde in dankenswerter Weise
unterstützt durch ein Stipendium nach dem Gra-
duiertenförderungsgesetz und durch eine Sachbei-
hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft
(Kl 193/9).



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 6.8.1976

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr. Fr. Neurath

Referent: Prof.Dr. T.O. Kleine

Correferent: Prof.Dr. W. Wesemann

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.	Einleitung 5
2.	Methodik 9
2.1.	Material 9
2.1.1.	Zubereitung der Knorpelschnitte 9
2.2.	Inkubationsversuche in der Warburg-Apparatur
2.2.1.	Zusammensetzung des Mediums 9
2.2.2.	Dosierung der radioaktiven Bausteine der CSP-Synthese 10
2.2.3.	Versuchsablauf 11
2.2.4.	Manometrische Kontrolle der biologischen Reaktion 12
2.3.	Extraktionsversuche an den inkubierten Knorpelschnitten 14
2.3.1.	Herstellung der GuaHCl-Lösungen 14
2.3.2.	Versuchsablauf 14
2.4.	Aufarbeitung der inkubierten Knorpel- schnitte und Extrakte 16
2.4.1.	Dialysen 16
2.4.2.	Isolierung der ChS-Peptide aus Knorpel- schnitten 17
2.4.3.	Isolierung der ChS-Peptide aus den Extrakten
2.4.4.	Reinigung der ChS-Peptide 18
2.4.5.	Isolierung und Messung der DNS 18
2.4.5.1.	DNS-Bestimmung 19
2.4.6.	Isolierung des Gesamt- und Restproteins 19
2.5.	Bausteinanalysen 21
2.5.1.	Bestimmung von Glucuronsäure 21
2.5.2.	Bestimmung von Sulfatestern 21
2.5.3.	Bestimmung des Gesamt- und Restproteins 23
2.5.4.	Bestimmung von Aminosukcern 23
2.6.	Messung der Radioaktivität 25
2.6.1.	Messung von neutralen wässrigen Proben 25
2.6.2.	Messung von alkalischen Proben 25

	Seite
2.7.	Statistische Berechnungen 26
3.	Ergebnisse 27
3.1.	Biochemische Ergebnisse 27
3.1.1.	Untersuchungen zur Methodik 27
3.1.1.1.	Die CO ₂ -Produktion während der Inkubation 27
3.1.1.2.	Einfluß des Dialysierens auf die biochemische Zusammensetzung des dialysierten Materials
3.1.1.3.	Einfluß der TCE-Fällung auf die biochemische Zusammensetzung des dialysierten Materials
3.1.2.	Die Zusammensetzung des Kälberknorpels und dessen Extrakte 30
3.1.3.	Die Zusammensetzung der ChS-Peptide des Kälberknorpels und dessen Extrakte 33
3.2.	Radiobiochemische Ergebnisse 38
3.2.1.	Der Einbau von Hexosamin 38
3.2.1.1.	Dialysierte Extrakte 38
3.2.1.2.	Isoliertes und gereinigtes Material 43
3.2.2.	Der Einbau von Sulfatestern 43
3.2.2.1.	Dialysierte Extrakte 43
3.2.2.2.	Einbauraten im isolierten u. gereinigten Mat.
3.2.3.	Der Einbau von Prolin 49
3.2.3.1.	Die Einbauraten in dialysierten Extrakten
3.2.3.2.	Die Einbauraten des Prolin am isolierten und gereinigten Material 50
3.2.4.	"Pulse-Chase"-Versuche 50
3.2.4.1.	Der Einbau von Hexosamin 50
3.2.4.2.	Der Einbau von Sulfatestern 55
3.2.4.3.	Der Einbau von Prolin 56
4.	Diskussion 60
5.	Zusammenfassung 63
6.	Literaturangaben 65

Abkürzungen

ChS	Chondroitinsulfat
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CSP	Chondroitinsulfatprotein
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fg	Feuchtgewicht
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GlcS	Glucuronsäure
GuaHCl	Guanidiniumchlorid
M.G.	Molekulargewicht
PG	Proteoglycan
Rpm	Umdrehungen/Minute
TCE	Trichloressigsäure

1. EINLEITUNG

Frühere in-vivo-Untersuchungen mit radioaktiven Vorstufen der Proteoglycan-Biosynthese haben gezeigt, daß Sulfatester, Polysaccharid- und Proteinanteil von Proteoglycanen des Knorpelgewebes eine gleiche Umsatzrate besitzen, nämlich zwischen 15 und 20 Tagen (Bostrom, 1952; Schiller et al., 1956; Gross et al., 1960). Bei weiteren Untersuchungen konnte eine metabolische Heterogenität des Proteoglycanpools festgestellt werden: So wiesen die löslichen Fraktionen des Knorpels eine Halbwertszeit von 10 - 20 Tagen auf, der unlösliche Rückstand hingegen eine solche von 4 Monaten (Davidson and Small, 1963). In-vivo-Untersuchungen an Knorpelgeweben von Meerschweinchen machten Proteoglycan-Pools mit schnellem (Halbwertszeit 3 Tage) und langsamem Umsatz (Halbwertszeit 30 - 80 Tage) sehr wahrscheinlich (Lohmander et al., 1973).

In-vitro-Einbaustudien mit Knorpelgeweben haben gezeigt, daß offenbar längere Chondroitinsulfat-Seitenketten eine andere Markierungsrate aufweisen als kürzere (Kleine und Hilz, 1968; Kleine et al., 1968; Hardingham und Muir, 1970; Kleine, 1972).

Doppel-Markierungs-Studien mit ^3H -Leucin oder ^{14}C -Serin und $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ oder ^3H -Glucosamin geben im Kälberrippenknorpel Hinweise auf eine metabolisch-chemische Heterogenität der Proteoglycane (Kleine und Hilz, 1970; Kleine et al., 1971), die zu über 90% aus Chondroitinsulfaten bestehen (Kleine und Hilz, 1968).

Im Folgenden konnte dann ein strukturgebundener "Primer"-Pool aus Kälberrippenknorpel isoliert werden, der in-vitro neu synthetisiertes Material an verschieden lösliche Pools transferiert (Kleine, 1973^b, 1974). In der vorliegenden Arbeit werden weitere Versuche mit Kälberrippenknorpel präsentiert, welche diese These untermauern.

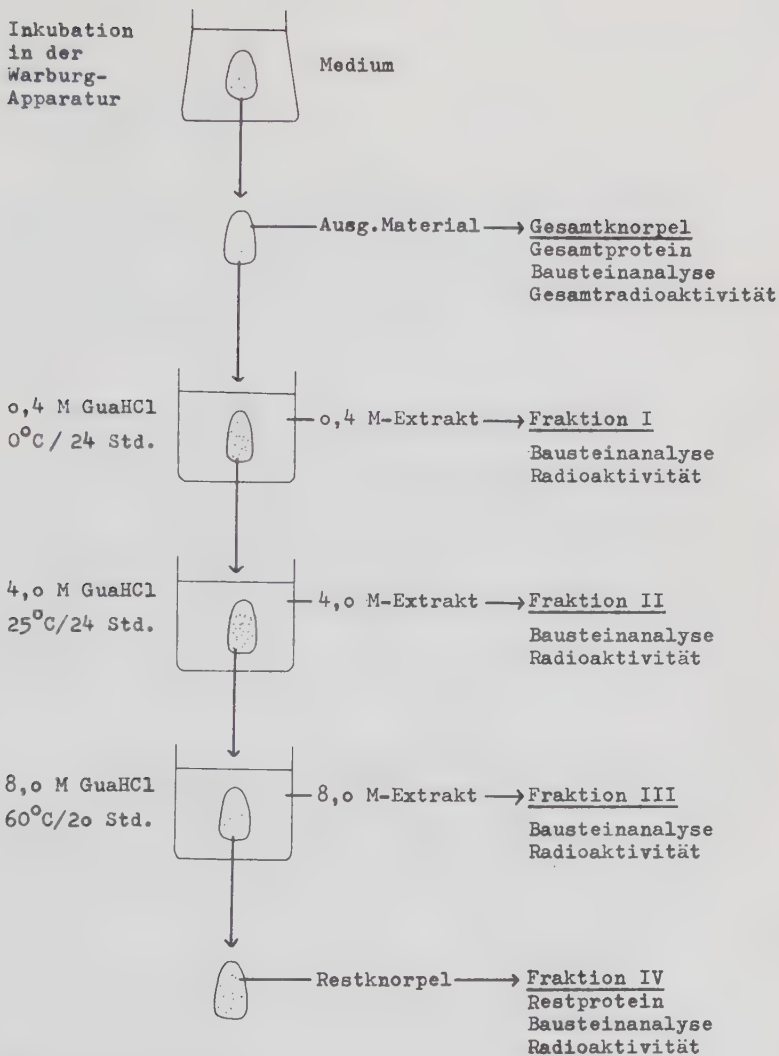
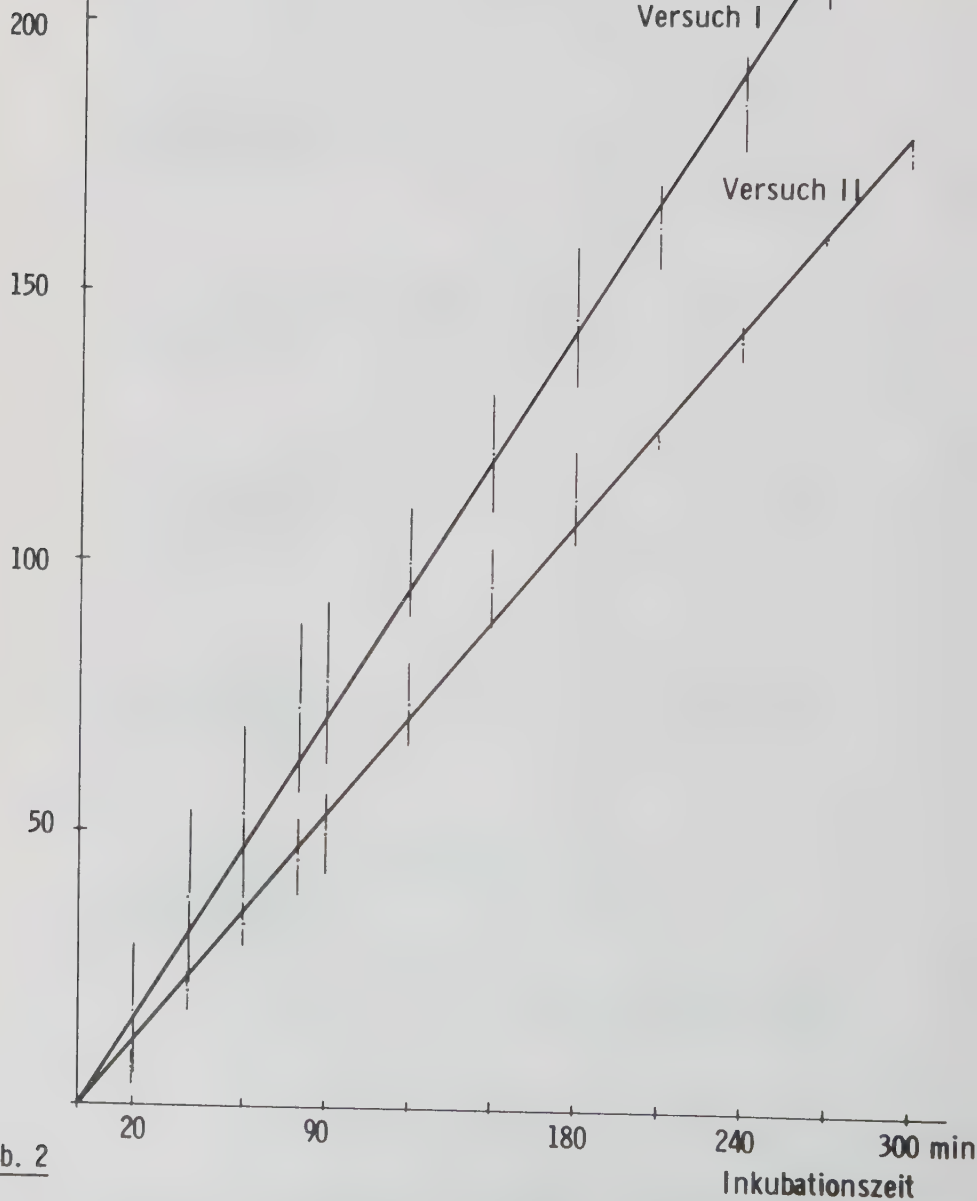


Abb. 1: Versuchsablauf

μMole
 CO_2
pro
100 mg
DNS

- 8 -



CO_2 -Produktion während der Inkubation in Abhängigkeit von der Zeit

Mittelwerte mit Standardabweichung

2. M E T H O D I K

2.1. MATERIAL

Untersucht wurde Rippenknorpel von 3 bis 5 Monate alten Kälbern, die 24 bis 48 Stunden vor Versuchsbeginn getötet worden waren. Die Rippen wurden auf Eis aufbewahrt und erst unmittelbar vor Versuchsbeginn freipräpariert.

2.1.1. ZUBEREITUNG DER KNORPELSCHNITTE

Die Kälberrippen wurden bei 4°C stumpf präpariert und vom Perichondrium befreit. Unverkalkte Rippen wurden mittels Mikrotom in 50 bis 100 µ dicke Scheiben geschnitten, diese bei 4°C in Petrischalen auf mediumgetränktem Filterpapier aufbewahrt.

(Mikrotom der Fa. Jung, Heidelberg)

2.2. INKUBATIONSVERSUCH IN DER WARBURG-APPARATUR

Die Knorpelschnitte wurden in Medien mit verschiedenen radioaktiv markierten Vorstufen der CSP-Biosynthese bei 37°C unterschiedlich lange inkubiert.

2.2.1. ZUSAMMENSETZUNG DES MEDIUMS

Das Medium wurde aus drei Grundlösungen frisch angesetzt:

100 ml Grundlösung 1,

50 ml Grundlösung 2,

50 ml Grundlösung 3,

mit H₂O bidest ad 500 ml aufgefüllt.

Grundlösung 1: 57,04 g NaCl p.A.; 1,60 g KH_2PO_4 p.A.;
3,50 g KCl p.A.; 2,20 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
p.A.; 50,00 ml 0,1N H_2SO_4 p.A.; in
1000 ml Aqua bidest gelöst und mit
2N NaOH auf pH 7,2 eingestellt.

Grundlösung 2: 8,40 g NaHCO_3 p.A. in 250 ml Aqua
bidest gelöst.

Grundlösung 3: 11,50 g Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$ in 250 ml Aqua
bidest gelöst.

2.2.2. DOSIERUNG DER RADIOAKTIVEN BAUSTEINE DER CSP-SYNTHESE

Pro Ansatz (2,00 g Knorpelschnitte) wurde folgende
Menge Radioaktivität eingesetzt:

Ansatz 1: 50 bzw. 100 μCi $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ trägerfrei
(bezogen von Fa. Buchler, Braunschweig).

Ansatz 2: 80 μCi L-Prolin-3,4- $^3\text{H}(\text{N})$. HCl
(spez. Aktivität 38 Ci/mM),

Ansatz 3: 50 μCi D-Glucosamin-6- $^3\text{H}(\text{N})$. HCl
(spez. Aktivität 3,64 Ci/mM),
(beides bezogen von Fa. NEN, Dreieichenhain).

Eine entsprechende Menge wurde den Originalgefäßen
entnommen und mit Medium auf 0,2 ml pro Ansatz
aufgefüllt.

2.2.3. VERSUCHSABLAUF (Abb. 1)

Zu jedem Ansatz gehörten acht gleichartige Versuche.

Pro Versuch wurde ein kolbenförmiges Warburggefäß im Eisbad mit 26,80 ml Medium und $2,00 \pm 0,08$ g fehlerfrei geschnittenen Knorpelscheiben sowie mit 0,200 ml radioaktivem Medium im Seitenarm beschickt. Diese Kolben wurden in der Warburg-Apparatur (Modell V85 der Fa. Braun, Melsungen, Schüttelfrequenz = 75 min^{-1}) mit angeschlossenen Manometern zunächst 20 min vorinkubiert unter Begasung mit einem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch ($\text{N}:\text{CO}_2 = 95:5$), dann für folgende Versuchszeiten unter Standardbedingungen inkubiert:

Versuche 1 und 2: je 20 Minuten

Versuche 3 und 4: je 90 Minuten

Versuch 5: 180 Minuten

Versuche 6 und 7: je 300 Minuten

Versuch 8: 20 Minuten, nachfolgend
280 Minuten in inaktivem Medium.

("Pulse-Chase")

Zum Zeitpunkt $t=0$ wurden die Radioaktivitäten durch Kippung der Gefäße mit dem Medium vereinigt, das System zum Druckausgleich 30 Sekunden belüftet, dann die Hähne geschlossen und die Manometer fortlaufend abgelesen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Gefäße in Eis gebracht und die Reaktion durch Zugabe von 10,0 ml eiskaltem Medium gestoppt.

Versuch 8 wurde danach sofort bei 4°C weiterbehandelt:

Das Medium wurde gesammelt, die Knorpel im Warburggefäß viermal mit 20,0 ml eiskaltem inaktiven

Medium (+ 0,25M L-Prolin reinst, bzw. 0,25M D-Glucosamin reinst) gewaschen, zwischen Filterpapier abgetupft, erneut mit zweimal 20,0 ml obigem Medium gewaschen und mit 27,0 ml Medium ohne Zusatz in ein frisches Warburggefäß gebracht. Dieses wurde für 280 min (unter Begasung in den ersten 20 min) weiter inkubiert wie oben, danach die Reaktion im Eisbad mit 10,0 ml eiskaltem Medium gestoppt.

2.2.4. MANOMETRISCHE KONTROLLE DER ANAEROBEN GLYCOLYSE (Umbreit et.al., 1964)

Pro Versuch wurden zwei Thermo-Barometer mit je 29,0 ml inaktivem Medium ohne Knorpelschnitte mitgeführt, um einen Korrekturwert für relevante Änderungen der Außenbedingungen zu erhalten.

Aus den abgelesenen Manometerwerten wurde die pro Versuch entwickelte Menge CO_2 errechnet nach der Formel

$$X_{\mu\text{l}} = K \cdot h_{\text{mm}}$$

Dabei bedeuten:

$X_{\mu\text{l}}$ = gebildete CO_2 -Menge in μl (auf 760 mm Hg und 0°C bezogen).

K = Gefäßkonstante (alle während des Versuchs konstanten Faktoren, s.u.).

h_{mm} = Manometrische Differenz (in mm, korrigiert durch die Werte der Thermo-Barometer).

Die Gefäßkonstante wurde für jeden Versuch berechnet nach der Formel

$$K = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{P_o}$$

Dabei bedeuten:

- V_g : Gesamtes Volumen des Reaktionsgefäßes
inclusive Manometer bis zum Flüssigkeits-
pegel bei Ausgangsstellung, abzüglich V_f .
 V_f : Volumen der eingebrachten Probenmenge
(hier 29,0 ml).
 T : absolute Temperatur (hier $310^{\circ}\text{K} = 37^{\circ}\text{C}$).
 α : Bunsen'scher Absorptionskoeffizient für
 CO_2 bei 37°C (hier 0,567).
 P_o : Normaldruck = 10 000 mm Säule einer
Brodie'schen Lösung, (die hier als Sperr-
flüssigkeit verwendet wurde).

Der Wert $X_{\mu\text{l}}$ wurde dann für jeden Versuch mit der
Gasvolumenkonstante (1 Mol Gas unter Normalbe-
dingungen = 22,4 l) in μMol umgerechnet und, auf
eine Stunde und 1 g Knorpelfeuchtgewicht bzw.
0,1 g DNS bezogen, angegeben. (Abb. 2)

2.3. EXTRAKTIONSVERSUCHE AN DEN INKUBIERTEN
KNORPELSCHNITTEN
(s. Kleine, 1973a)

Nach der Inkubation in der Warburg-Apparatur wurden vier Proteoglycan-Fractionen aus dem nacheinander in 0,4M (bei 0°C, Extrakt 1), 4,0M (bei 25°C, Extrakt 2) und 8,0M (bei 60°C, Extrakt 3) Guanidiniumchlorid gebrachten Knorpel extrahiert. (Fraktion 4 = im Knorpel verbliebene, nicht durch 8,0M GuaHCl extrahierbare Fraktion).

2.3.1. HERSTELLUNG DER GuaHCl-LÖSUNG

0,4M Lösung: Bestimmung des Volumens des gesamten Mediums, pro 1 ml Zugabe von 38,22 mg GuaHCl (Merck), Einstellung auf pH 5,8 mit 2N CH_3COOH nach pH-Papier (Fa. Lyphan).

4,0 und 8,0M Lösungen: 38,22 bzw. 76,44 g GuaHCl (Merck) in 90 ml Aqua bidest lösen, mit 20% NaOH auf pH 8,0 mit 2N CH_3COOH auf pH 5,8 am pH-Meter einstellen, auf 100 ml auffüllen (Aqua bidest), pH gegebenenfalls korrigieren.

2.3.2. VERSUCHSABLAUF (s. Abb. 1)

Nach Abstoppen der Reaktion (s.2.2.3) wurden die Medien einzeln gesammelt. Die Knorpelschnitte wurden bei 4°C zwischen Filterpapier abgetupft und gewogen, eine definierte Menge

(etwa 200 mg) der Knorpelschnitte wurde zur quantitativen Analyse des Gesamtknorpels entnommen, eine weitere Menge von etwa 100 mg zur Bestimmung des Gesamtproteins. Die verbliebene Knorpelsubstanz wurde in das Medium (auf 0,4M GuaHCl und pH = 5,8 eingestellt) zurückgebracht und im Becherglas bei 0°C im Eisbad 24 Stunden gerührt.

(Magnetrührer Stiromatic M III, Fa. Hübscher, Hamburg).

Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Schnitte bei 4°C nach Abfiltern des Mediums auf Nylonfiltern zweimal mit je 2 ml 0,4M GuaHCl (pH 5,8) gewaschen, zwischen Filterpapier abgetupft und gewogen. Die Schnitte wurden danach in 20 ml 4,0M GuaHCl (pH 5,8) in verschlossenen Bechergläsern 24 Stunden lang gerührt bei 25°C.

Nach dieser Extraktion wurden Schnitte und Extraktionslösungen entsprechend wie oben behandelt und in verschlossenen Bechergläsern in 20 ml 8,0M GuaHCl (pH 5,8) bei 60°C im Wasserbad 20 Stunden gerührt.

Anschließend wurden die Extraktionslösungen abfiltriert, die Schnitte zweimal mit je 3 ml 8,0M GuaHCl (pH 5,8) gewaschen, mit Filterpapier abgetupft und gewogen. Der Rest der Schnitte wurde quantitativ analysiert (Restknorpel).

Alle Extraktionslösungen, vereinigt mit den entsprechenden Waschlösungen, wurden getrennt bei -20°C aufbewahrt.

2.4. AUFARBEITUNG DER INKUBIERTEN KNORPEL-
SCHNITTE UND EXTRAKTE

Aus den drei Extrakten wurde eine rohe Proteoglycanfraktion isoliert. Aus dieser und aus den Schnitten wurde mittels Papa-indigestion und CPC-Fällung eine Chondroitinsulfat-Peptidfraktion präpariert.

2.4.1. DIALYSEN

Zur Entfernung der freien Radioaktivität und des Mediums wurden Schnitte und Extrakte gegen Aqua bidest (mindestens je 80 l) bei 4°C acht bis vierzehn Tage lang dialysiert. Um den Einfluß der Porengröße der Schläuche auf Verluste bei der Dialyse zu untersuchen, wurden die 0,4M Extrakte in verschiedenen Schläuchen dialysiert.

1. Fa. Union Carbide, Porengröße:
10 000 - 20 000 M.G.
2. Fa. Spectrum medical industries, Los Angeles,
Porengröße: 6000 - 8000 M.G.

Um den Einfluß der Dialysendauer auf etwaigen Verlust an Material, bzw. die optimale Abtrennung freier Radioaktivität zu untersuchen, wurden einige Extrakte zweimal in Schläuchen unterschiedlicher Porengröße dialysiert.

(s. 3.1.1.2.)

2.4.2. ISOLIERUNG DER ChS-PEPTIDE AUS KNORPELSCHNITTEN

Die Schnitte wurden in verschlossenen Gefäßen in EDTA-Na-Azetat-Puffer (pH 6,25) mit Papain (an CM-Cellulose gebunden, Merck) 48 Stunden im 60°C-Wasserbad geschüttelt (Schüttelfrequenz = 100 min⁻¹).

Nach Abkühlung im Wasserbad wurde TCE zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 5% TCE entstand; nach einer Stunde Reaktionszeit in Eis wurde 20 min bei 6000Rpm zentrifugiert, die Überstände gesammelt. Der papain-unverdauliche Rückstand wurde zweimal mit 1 ml TCE 5% (eiskalt) gewaschen, die gesammelten Überstände mit kristallinem NaHCO₃p.A. neutralisiert (pH 5,8) und dialysiert (Schläuche Fa. Union Carbide).

2.4.3. ISOLIERUNG DER ChS-PEPTIDE AUS DEN EXTRAKTEN

Die dialysierten Extrakte wurden durch Zugabe von entsprechender Menge EDTA-Na-Acetat-Puffer (vierfach) auf die gewünschte Pufferkonzentration (s.o.) gebracht, mit 10 mg Papain (s.o.) versetzt, wie oben 24 Stunden bei 60°C inkubiert, erneut mit 10 mg Papain versetzt, weitere 24 Stunden inkubiert, dann wie oben TCE-gefällt und dialysiert.

Der vollständige Aufschluß mittels Papain digestion wurde durch Untersuchung des Materials und Carbazolreaktion vor und nach TCE-Fällung geprüft. (s. 3.1.1.3.)

2.4.4. REINIGUNG DER Ch-S-PEPTIDE MITTELS
CPC-ALKOHOL-FÄLLUNG
(Kleine et al., 1968)

Die Proben wurden mit Cetylpyridinium-Chlorid (CPC) versetzt (mindestens 300-400 mg auf 100 μ Mol GlcS) und bei 37°C eine Stunde inkubiert, dann über Nacht im Eisbad stehengelassen. Dann wurden sie bei 10°C und 20 000 Rpm 60 min zentrifugiert, die klaren Überstände mit Pipetten dekantiert, die Niederschläge dreimal mit 3 ml Waschlösung (0,1% CPC) gewaschen, bei 20 000 rpm und 25°C zentrifugiert, die klaren Überstände wurden dekantiert. Die Niederschläge wurden in 4 ml 2M $MgCl_2$ -Lösung mit 1 ml Methanol p.A. bei 37°C vollständig gelöst, mit 12,5 ml eiskaltem Äthanol p.A. gefällt und 12 Stunden im Eisbad stehengelassen, dann bei 0°C und 20 000 rpm zentrifugiert, klare Überstände dekantiert, zweimal bei 0°C mit 80% Äthanol p.A. (eiskalt) gewaschen.

Die so gereinigten Niederschläge wurden in 2 ml Aqua bidest aufgenommen und dann dialysiert (Schläuche der Fa. Union Carbide).

2.4.5. ISOLIERUNG UND MESSUNG DER DNS

Aus den papainunverdaulichen Resten (Gesamtknorpel, Extrakte, Restknorpel) wurde nach dem Waschen mit 5% TCE die DNS isoliert und gemessen:

Die Rückstände wurden zweimal mit 2 ml 99% Äthanol p.A. (eiskalt) gewaschen, bei 6000 rpm zentrifugiert, abpipettiert. Dann wurden sie genau 15 min in 3 ml 5% TCE im 90°C-Wasserbad inkubiert, dreimal gemixt, zentrifugiert, dekantiert, die restlichen Niederschläge mit 1 ml 5% TCE gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden zur DNS-Bestimmung mittels der Diphenylreaktion herangezogen.

2.4.5.1. DNS-BESTIMMUNG (Schneider, 1957)

1 ml Probe und 2 ml Diphenylreagenz werden 10 min in kochendes Wasserbad gestellt, abgekühlt und bei 600 nm in 2 cm - Küvetten im Zeiss-Spektrometer abgelesen.

(Extinktionskoeffizient: $E_{2\text{cm}}^{600} = 2,733$
für 1 mg).

Diphenylreagenz: 1 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig gelöst, Zugabe von 2,75 ml konzentrierter H_2SO_4 .

Standard: 2 g/l DNS Serva 18570.

2.4.6. ISOLIERUNG DES GESAMT- UND RESTPROTEINS (Kleine et al., 1968)

Aus den vor Beginn der Extraktion entnommenen Schnitten wurde das Gesamtprotein isoliert, aus den Schnitten nach der 8,0M Extraktion das Restprotein.

Die Schnitte wurden 24 Stunden bei 0°C mit 5% TCE extrahiert, die TCE in dieser Zeit dreimal ge-

wechselt, bei 6000 Rpm zentrifugiert, die klaren Überstände verworfen, dann 20 Stunden mit Azeton (eiskalt) extrahiert, bei 6000 Rpm zentrifugiert, die klaren Überstände verworfen.

Die Restschnitte wurden dann mit 2 ml 5% TCE 20 min im 90°C-Wasserbad erhitzt, bei 6000 Rpm zentrifugiert, die Niederschläge dreimal mit 3 ml 5% TCE (eiskalt) gewaschen, die Überstände verworfen. Die Gefäßwände wurden gesäubert.

Die Niederschläge wurden dann in 1 ml 1N NaOH gelöst und das erhaltene Protein mittels der Biuret-Reaktion bestimmt.

2.5. BAUSTEINANALYSEN

2.5.1. BESTIMMUNG VON GLUCURONSÄURE MITTELS

CARBAZOL-REAKTION

(Bitter und Muir, 1962)

Reagenzien:

1: Schwefelsäure-Reagenz

0,25M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ p.A. in konz.

H_2SO_4 p.A. ($d = 1,84$)

2: Carbazol-Reagenz

1,25 g/l Carbazol, purum (Merck) in absolutem
Methanol p.A.

3: Standardlösung

100 mg Glucuronsäure-Lacton in 100 ml Aqua bidest.

Ausführung:

Reagenzgläser im Eisbad mit 5 ml Schwefelsäure-Reagenz beschicken, 1 ml Probe zugeben und im Eisbad mixen; danach 10 min in ein heftig kochendes Wasserbad, nach Abkühlung im Leitungswasserbad jede Probe mit 0,2 ml Carbazol-Reagenz versetzen, mixen und 15 min in kochendes Wasserbad. Ablesen in 1 cm-Küvetten im Eppendorff-Photometer bei $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Extinktionskoeffizient: $E_{\mu\text{Mol}} = 3,060$.

2.5.2. BESTIMMUNG VON SULFATESTERN MITTELS

BENZIDIN-REAKTION

(Kleine et al., 1968)

Reagenzien:

1: 1 g Benzidin p.A. (Merck) auf 100 ml absol.

Äthanol p.A.

2: 1N HCl p.A.

3: Natriumnitrit-Reagenz

200 mg NaNO_2 p.A. auf 100 ml Aqua bidest.

4: Thymol-Reagenz

500 mg Thymol p.A. und 7,5 g NaOH auf 100 ml Aqua bidest.

5: Konzentrierte HCOOH p.A.

6: Feinkörniger Glassand p.A. (Merck)

7: Schwefelsäure-Standardlösung 1N H_2SO_4 .

Ausführung:

Für jede Analyse wurde eine Eichkurve aus 12 Werten und 4 Leerwerten gefahren.

Hydrolyse: 1 ml Probe und 0,6 ml HCOOH im Reagenzglas mixen, zuschmelzen, 10 Stunden bei 100°C im Wasserbad hydrolysieren, Gläser öffnen, 0,4 ml H_2O bidest zusetzen, mixen.

Analyse: Hiervon 1,5 ml entnehmen, mit 3,75 ml Benzidin-Reagenz versetzen, 2 Stunden in Eis stellen, dann 0,1 g Glassand zusetzen. Bei 4°C weiterarbeiten: 10 min 6000 Rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, Gläser umgekehrt auf Filterpapier stellen, nach 10 min um die Öffnung herum waschen, außen mit Azeton, innen mit in Äthanol (abs.p.A.) getränkten Watteträgern. Gläser im Eisbad mit 9 ml Äthanol abs. p.A. waschen, abzentrifugieren, Gläser umgekehrt auf Filterpapier stellen, für 5 min.

Bei Zimmertemperatur weiterarbeiten:

Niederschlag in 2,5 ml HCl aufnehmen, nach 5 min 1 ml NaNO_2 -Reagenz, dann 4 ml Thymol-Reagenz zugeben, mixen, 10 min bei 6000 Rpm zentrifugieren;

vom klaren Überstand 0,3 ml auf 3 ml mit Aqua bidest auffüllen, Rotfärbung im Zeiss-Photometer bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ in 1 cm - Küvetten ablesen.

2.5.3. BESTIMMUNG DES GESAMT- UND RESTPROTEINS MITTELS BIURET-REAKTION

Reagenzien:

- 1: Biuret-Reagenz: 9,0 g K-Na-Tartrat, 3,0 g CuSO_4 in 400 ml 0,2N NaOH lösen, dann 5,0 g KJ zusetzen und auf 1000 ml mit NaOH auffüllen.
- 2: Eichlösung 100 g Rinderalbumin in 100 ml Aqua bidest.

Ausführung:

0,50 ml Probe und 1 ml Biuret-Reagenz mixen, 30 min inkubieren, 2 min abzentrifugieren und bei 546 nm in 2 cm - Küvetten im Eppendorff-Photometer ablesen.

Extinktionskoeffizient: $E_1 \text{ mg} = 0,337$

2.5.4. BESTIMMUNG VON AMINOZUCKERN MITTELS ELSON-MORGAN-REAKTION (Antonopoulos et al., 1964)

Reagenzien:

- 1: 1,25N Na_2CO_3 x 10 H_2O in Aqua bidest,
- 2: Acetyl-Aceton-Reagenz
3% Acetyl-Aceton p.A. in 1,25N Na_2CO_3 x 10 H_2O (unmittelbar vor Gebrauch hergestellt).

3: EHRLICH's Reagenz

2,5 g p-Dimethylaminobenzaldehyd p.A.
in 30 ml konz. (rauchend) HCl (37%) und 30 ml
Äthanol absolut p.A. im Eisbad lösen.

4: Eichlösung

10 mg Glucosamin-HCl in 100 ml Aqua bidest.

Ausführung:

Hydrolyse: 0,5 ml Probe und 0,5 ml HCl (37%) verschlossen 6 Stunden bei 100°C im Wasserbad hydrolysieren, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einengen, 1 ml H₂O zugeben, nochmals einengen, jede Probe in 0,25 ml Aqua bidest aufnehmen.

Analyse: Probe (0,25 ml) und 0,5 ml Acetyl-Aceton-Reagenz mixen, im verschlossenen Glas 60 min im Wasserbad bei 90°C inkubieren, im Leitungswasserbad kühlen; dazu 2 ml Äthanol abs. p.A. und 0,25 ml Ehrlich's Reagenz, mixen, nach genau 30 min (Reaktion ist sehr zeitabhängig) im Zeiss-Spektralphotometer in 2 cm - Küvetten bei $\lambda = 535 \text{ nm}$ ablesen.

Extinktionskoeffizient: $E_{\mu\text{Mol}} = 12,470$.

2.6. MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT

Die Messung der mit ^{35}S und ^3H markierten Proben wurde in Dioxan-Szintillator-Lösungen im Liquid Szintillation Counter (Fa. Packard, Frankfurt; Modell 3380) vorgenommen, der aus den gemessenen Impulsen die jeweiligen Zerfälle pro Minute errechnet und angibt. Eichung und Einstellung erfolgte gemäß den Anweisungen der Fa. Packard, Frankfurt.

2.6.1. MESSUNG VON NEUTRALEN WÄSSRIGEN PROBEN

Bis zu 1 ml Probe wurde in 15 ml Dioxan-Szintillator folgender Zusammensetzung eingebracht:

8,0 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) für Szintillationsmessungen (Merck),

0,6 g 2,2-p - Phenylen-bis (4-methyl-5-Phenyloxazol) (Dimethyl-PoPoP) für Szintillationsmessungen (Merck)

150 g Naphthalin für Szintill.Mess. (Merck),
gelöst in 1 l Dioxan für Szintill.Mess. (Merck).

2.6.2. MESSUNG VON ALKALISCHEN PROBEN

Bis zu 0,5 ml Probe wurden in 15 ml Dioxan-Szintillator eingebracht. Der Dioxan-Szintillator enthielt neben den oben angegebenen Zusätzen pro 1 l noch

50 g Thixotropic Gel Powder (Cab-O-Sil)

(Fa. Packard, Frankfurt).

2.7. STATISTISCHE BERECHNUNGEN

Aus entsprechenden Versuchsergebnissen wurden die arithmetischen Mittel mit ihren Standardabweichungen ermittelt. Verschiedene Kollektive wurden mittels des Student-t-Wertes auf signifikante Unterschiede hin getestet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe einer Diehl-Combitron-Rechenmaschine (mit Sonderprogramm) nach Programmen der Firma Diehl durchgeführt.

1. Arithmetische Mittel

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

2. Standardabweichung

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i)^2 \cdot \frac{1}{n} \cdot (\sum x_i)^2}{n-1}}$$

3. Student-t-Wert

$$t = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{r_{\bar{x}-\bar{y}}}$$

$$\text{wobei } r_{\bar{x}-\bar{y}} = S_{x+y} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2 + \sum (\bar{y} - y_i)^2}{n_x - 1 + n_y - 1}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}}$$

Dabei bedeuten:

n_x, n_y : Anzahl der Werte im Kollektiv

$\bar{x}, \bar{y}$: arithmetische Mittel der Werte

S_x, S_y : Standardabweichungen im Kollektiv

$r_{\bar{x}-\bar{y}}$: Streuung der Differenz der arithmetischen Mittel

t : Student-t-Wert.

3. E R G E B N I S S E

3.1. BIOCHEMISCHE ERGEBNISSE

3.1.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR METHODIK

3.1.1.1. DIE CO₂-PRODUKTION WÄHREND DER INKUBATION

Alle Kurven der CO₂-Produktion steigen über die gesamte Versuchszeit linear an (Abb. 2), und zwar sowohl auf 1 g Frischknorpel bezogen, als auch auf den Gehalt an DNS (als Maß für die Zellzahl). Das gilt insbesondere auch für die Versuche Nr.8, die nach dem "Pulse-Chase" in nicht radioaktivem Medium 280 min lang weiterinkubiert wurden. Damit weisen die Knorpelzellen während der ganzen Inkubationsperiode eine gleichmäßige anaerobe Glycolyserate auf.

3.1.1.2. EINFLUSS DES DIALYSIERENS AUF DIE BIOCHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DES DIALYSIERTEN MATERIALS

Die bei einigen Versuchen (Tab.1) aufgetretenen Verluste an carbazolpositivem Material lassen sich nicht durch die Verwendung von Schläuchen mit unterschiedlicher Porengröße erklären, sondern gehen offensichtlich auf den unterschiedlichen Gehalt an Glucose im Medium zurück, die mit dem Carbazol-Reagenz (nach Bitter und Muir) interferiert.

Weder die doppelte Dialysendauer, noch die Verwendung von größer-porigen Schläuchen brachten Verluste an carbazol-positivem Material beim

Ansatz (je n=8)	Glucose (mM) im Medium	Porengröße M.G.	Carbazol-positives Material pMol/g Feuchtgewicht vor Dialyse nach Dialyse	Verlust
A	0,58	6000 - 8000	17,1 $\pm$ 2,3	14,1 $\pm$ 3,3
B	11,6	6000 - 8000	23,1 $\pm$ 3,1	10,7 $\pm$ 2,4
C	11,6	10 000 - 20 000	28,6 $\pm$ 3,0	9,1 $\pm$ 2,0

Tab. 1: Carbazol-positives Material im 0,4 M-Extrakt vor und nach Dialyse
(Dialyse 16 Tage gegen 10 x 8 l Aqua bidest)

Ansatz (je n=8)	Porengröße M.G.	Carbazol-positives Material pMol/g Feuchtgewicht nach 1. Dialyse nach 2. Dialyse	Verlust	Verlust an spez. Radioaktivität dpm/ μ Mol GlCS
3 H-Glucosamin (0,4 M-Extrakt)	6 000 - 8 000	14,0 $\pm$ 3,3	14,8 $\pm$ 3,4	0%
35 S-Sulfat (0,4 M-Extrakt)	10 000 - 20 000	10,7 $\pm$ 2,4	10,3 $\pm$ 2,6	3,8%
3 H-Glucosamin (4,0 M-Extrakt)	10 000 - 20 000	91,2 $\pm$ 6,2	86,0 $\pm$ 9,9	5,6%
35 S-Sulfat (4,0 M-Extrakt)	10 000 - 20 000	83,1 $\pm$ 4,8	81,3 $\pm$ 4,0	2,2%

Tab. 2: Verluste an Carbazolpositivem Material und an spezifischer Radioaktivität
nach ein- und zweimaliger Dialyse (Dialyse je 16 Tage gegen 10 x 8 l Aqua bidest).

0,4 M-Extrakt oder beim 4,0 M-Extrakt, die Verluste blieben innerhalb der Streubereiche (Tab. 2). Bei Verwendung gröberporiger Schläuche (Porengröße 10- 20 000 M.G.) tritt bei der zweiten Dialyse des 0,4 M-Extraktes noch ein Absinken der $^{35}\text{SO}_4$ -Radioaktivität um 60% auf, nicht dagegen bei Verwendung der feineren Schläuche (Porengröße 6 - 8 000 M.G.) beim ^3H -Glucosamin-Ansatz. Da aber der Glucuronsäuregehalt gleich bleibt, kann es sich nicht um Verluste an niedermolekularen ChS-Proteinen handeln, sondern nur um Verluste an freier Radioaktivität.

3.1.1.3. EINFLUSS DER TCE-FÄLLUNG AUF DIE BIOCHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DES DIALYSIERTEN MATERIALS

Der vollständige Aufschluß mittels Papain Digestion wurde durch Untersuchung des dialysierten Carbazol-positiven Materials vor und nach TCE-Fällung geprüft. Wie Tabelle 3 zeigt, läßt sich bei Papain Digestion des Gesamtknorpels ein Verlust nach TCE-Fällung nicht feststellen. Im Digest des Restknorpels tritt nach TCE-Fällung ein Verlust bis zu 10 % auf, der möglicherweise das Ausfällen größerer Carbazol-positiver Partikel anzeigt.

Zusammenfassung: Die Verwendung von gröberporigen Schläuchen bei der Dialyse ist also ohne Nachteil möglich. Zur Eliminierung aller freien $^{35}\text{SO}_4$ -Radioaktivität aus dem 0,4 M-Extrakt ist eine langdauernde Dialyse (über 30 Tage) notwendig.

Zur Vermeidung von Zersetzungserscheinungen wird bei 1-4°C dialysiert.

	µMol GlcS/ 1g Fg nach Dialyse, ohne TCE-Fällung	µMol GlcS/ 1g Fg nach TCE-Fällung und Dialyse
Papaindigest des Gesamt- knorpels	103,9 ± 7,3 n=8 1,00	109,8 ± 9,7 p<0,1 1,06
Papaindigest des Rest- knorpels	15,0 ± 1,4 n=8 1,00	13,5 ± 1,0 p<0,025 0,90

Tabelle 3: Einfluß der TCE-Fällung auf den Glucuronsäure-Gehalt im Papaindigest des Gesamt- und Restknorpels.

3.1.2. DIE ZUSAMMENSETZUNG DES KÄLBKNOCHENS UND SEINER EXTRAKTE, (Tab. 4,5,6)

Der 0,4 M-Extrakt enthielt 10 % der gesamten Sulfatester und je 14% der Glucuronsäure und des Hexosamins; 29% des gesamten Proteins und 19% der DNS wurden durch die 0,4 M-GuaHCl-Lösung extrahiert. Bei Extraktion mit 4,0 M-Guanidinium-HCl wurden 78% der Glucuronsäure, 81% der Hexosamine und 83% der Sulfatester sowie 48% der Proteine und 20% der DNS herausgelöst. Der 8,0 M-Extrakt enthielt nur noch weniger als je 1% der Parameter. Es verblieben als unextrahierbarer Rest 14% der Glucuronsäure, 11% der Hexosamine, 12% der Sulfatester, 19% der Proteine und 56% der DNS.

	Glucuronsäure μMol/1 g Fg	Hexosamin μMol/1 g Fg	Sulfatester μMol/1 g Fg	Protein mg/1 g Fg	DNS μg/1 g Fg
Gesamtknochen (dialysiertes Papaindigest)	120,3 [±] 16,6 n=32 1,00	118,1 [±] 12,3 n=8 1,00	105,3 [±] 13,9 n=16	45,3 [±] 4,2 n=8	499 [±] 105 n=31 1,00
0,4 M-Extrakt	14,0 [±] 6,0 n=32 0,14	16,7 [±] 4,1 n=8 0,14	10,7 [±] 2,5 n=16	13,4 [±] 1,4 n=7	94 [±] 47 n=24 0,19
4,0 M-Extrakt	93,2 [±] 12,2 n=32 0,78	95,4 [±] 7,4 n=7 0,81	87,3 [±] 11,2 n=16	21,7 [±] 1,5 n=8	99 [±] 50 n=24 0,20
8,0 M-Extrakt	1,1 [±] 0,1 n=15 0,01	1,1 [±] 0,3 n=7 0,01	1,2 [±] 0,1 n=8	0,6 [±] 0,4 n=7	4 [±] 3 n=16 0,01
Restknochen	16,4 [±] 3,3 n=31 0,14	12,9 [±] 2,0 n=8 0,11	12,3 [±] 2,5 n=16	8,6 [±] 1,2 n=8	279 [±] 51 n=32 0,56

Tab. 4: Zusammensetzung von Kälberknochen und seinen dialysierten Extrakten.
Werte bezogen auf 1g Feuchtgewicht.

	Glucuronsäure µMol/100 µg DNS	Hexosamin µMol/100 µg DNS	Sulfatester µMol/100 µg DNS	Protein mg/100 µg DNS
Gesamtknorpel (dialysiertes Papaindigest)	24,8 ± 4,7 n=32	30,7 ± 4,3 n=8	21,8 ± 3,8 n=16	7,3 ± 0,7 n=8
	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4 M-Extrakt	3,2 ± 1,0 n=24	4,3 ± 1,0 n=8	2,2 ± 0,7 n=16	2,2 ± 0,3 n=7
	0,13	0,14	0,10	0,30
4,0 M-Extrakt	19,2 ± 3,4 n=32	25,0 ± 2,0 n=7	18,2 ± 3,8 n=16	3,5 ± 0,5 n=8
	0,77	0,81	0,83	0,48
8,0 M-Extrakt	0,21 ± 0,04 n=23	0,28 ± 0,1 n=7	0,2 ± 0,0 n=8	0,2 ± 0,1 n=7
	0,01	0,01	0,01	0,03
Restknorpel	3,3 ± 5,4 n=32	3,3 ± 0,5 n=8	2,5 ± 0,5 n=16	1,4 ± 0,3 n=8
	0,13	0,11	0,12	0,19

Tab. 5: Zusammensetzung von Kälberknorpel und seinen dialysierten Extrakten.
Werte bezogen auf 100 µg DNS

	Hexosamin pro Glucuronsäure	Sulfatester pro Glucuronsäure	Hexosamin pro Sulfatester
Gesamtknorpel (dialysiertes Papaindigest)	0,99 ± 0,05 n=8	0,97 ± 0,08 n=16	0,98
0,4 M-Extrakt	1,19 ± 0,06 n=8 p<0,001	1,12 ± 0,09 n=12 p<0,001	0,94
4,0 M-Extrakt	1,03 ± 0,08 n=7 p<0,001	1,00 ± 0,13 n=16 p<0,008	0,97
8,0 M-Extrakt	1,06 ± 0,16 n=5	1,13 ± 0,06 n=7 p<0,02	1,07
Restknorpel	1,03 ± 0,05 n=7	0,77 ± 0,04 n=16 p<0,001	0,75

Tab. 6: Zusammensetzung des Kalberknorpels und seiner dialysierten Extrakte. p bezieht sich jeweils auf den Wert in der vorhergehenden Zeile.

Wurden die gemessenen Werte auf 100 µg DNS und damit auf eine bestimmte Menge von Zellen im Knorpel bezogen, änderte sich dieses Ergebnis nicht (Tab. 5).

Damit lassen sich die Proteoglycane des Kälberrippenknorpels in leichtlösliche, schwerlösliche und unlösliche Fraktionen präparativ aufteilen.

Im Gesamtknorpel kommen Glucuronsäuren und Hexosamine in einem molaren Verhältnis von 1:1 vor (Tab. 6). Im 0,4 M-Extrakt ist das Verhältnis signifikant höher (1,19) als in allen anderen, im 4,0 M, im 8,0 M und im Restknorpel nur geringfügig größer als 1.

Der Sulfatierungsgrad in isolierten ChS-Peptiden des Gesamtknorpels war etwas kleiner als 1. Von Fraktion zu Fraktion änderte sich der Sulfatierungsgrad signifikant:

1,12 im 0,4 M-Extrakt, 1,00 im 4,0 M-Extrakt, 1,13 im 8,0 M-Extrakt. Im Restknorpel war er deutlich kleiner als 1 (0,77). Damit kommt zu einer unterschiedlichen Löslichkeit eine chemische Heterogenität der isolierten Proteoglycanfraktionen.

3.1.3. DIE ZUSAMMENSETZUNG DER ChS-PEPTIDE DES KÄLBERRKNORPELS UND DESSEN EXTRAKTE

Nach Isolierung und Reinigung (CPC-Alkohol-Fällung) der ChS-Peptide (Tab. 7,8) zeigte sich gegenüber dem ungereinigten Material eine Abnahme der absoluten Mengen um etwa 10% bis 40%. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß methodische Verluste aufge-

	Glucuronsäure µMol /1g Fg	Hexosamin µMol /1g Fg	Sulfatester µMol /1g Fg	Glucuronsäure µMol/100µg DNS	Hexosamin µMol/100µg DNS	Sulfatester µMol/100µg DNS
Gesamtknorpel	101,1 [±] 15,9 n=24	104,9 [±] 8,7 n=6	99,6 [±] 16,8 n=8	21,1 n=24	27,2 n=6	20,0 n=8
0,4 M-Extrakt	12,9 [±] 2,7 n=10	13,3 [±] 5,4 n=8	13,4 [±] 3,7 n=13	2,2 n=10	3,5 n=8	1,6 n=13
4,0 M-Extrakt	69,6 [±] 17,3 n=23	68,9 [±] 6,7 n=8	59,1 [±] 9,2 n=8	14,0 n=23	17,9 n=8	11,8 n=8
8,0 M-Extrakt	0,6 [±] 0,1 n=6	nicht ermittelt	0,7 [±] 0,04 n=6	0,1 n=6	nicht ermittelt	1,5 n=6
Restknorpel	10,2 [±] 1,5 n=21	10,2 [±] 0,9 n=8	8,0 [±] 3,0 n=8	2,2 n=21	2,6 n=8	1,6 n=8

Tab. 7: Zusammensetzung der isolierten und gereinigten ChS-Peptide im Kälberknorpel und dessen Extrakten. Werte bezogen auf 1g Fg und 100 µg DNS.

	Hexosamin pro Glucuronsäure	Sulfatester pro Glucuronsäure	Hexosamin pro Sulfatester
Gesamtknorpel	1,03 ± 0,04 n=8	1,01 ± 0,04 n=5	1,02
0,4 M-Extrakt	1,03 ± 0,08 n=8	1,04 ± 0,29 n=13	0,99
4,0 M-Extrakt	0,99 ± 0,03 n=7	0,95 ± 0,11 n=9	1,04
8,0 M-Extrakt	nicht bestimmt	1,21 ± 0,06 n=6	nicht bestimmt
Restknorpel	1,00 ± 0,04 n=7	0,75 ± 0,18 n=8	1,33

Tab. 8: Zusammensetzung der isolierten und gereinigten ChS-Peptide im Kalberknorpel und seinen Extrakten.

treten sind. Die molaren Verhältnisse der gemessenen Bausteine (Glucuronsäure, Hexosamine, Sulfatester) lagen ähnlich wie beim ungereinigten Material um 1, jedoch zeigte sich der 8,0 M-Extrakt als signifikant höher sulfatiert. (Tab. 8).

3.2. RADIOBIOCHEMISCHE ERGEBNISSE

3.2.1. DER EINBAU VON HEXOSAMIN

3.2.1.1. DIALYSIERTE EXTRAKTE

Der Einbau von radioaktivem Hexosamin steigt über die gesamte Versuchszeit stetig an, wobei auch noch nach 5 Stunden der Restknorpel die höchste spezifische Aktivität aufweist und die Extrakte dementsprechend geringer markiert sind (Abb. 3). Im Gesamtknorpel erfolgt eine lineare Zunahme der spezifischen Radioaktivität erst nach 90 min Inkubation, in den Extrakten z.T. noch später. Das neusynthetisierte Material scheint schwerer extrahierbar zu sein als älteres inaktives Material. Je stärker die verwendeten Guanidinium-HCl-Konzentrationen sind, desto höher markiert sind die isolierten Extrakte: der 0,4 M-Extrakt liegt deutlich unter dem 4,0 M, und dieser wiederum unter dem 8,0 M-Extrakt.

Bei Betrachtung der absoluten eingebauten Mengen der Radioaktivität ergibt sich ein anderes Verteilungsverhältnis:

Ob auf 1 g Fg bezogen (Abb.4), oder auf den DNS-Gehalt (Abb. 5), es ist eine stetige Zunahme des neusynthetisierten Materials zu beobachten. Hier hat aber entsprechend des hohen Gehalts an GlcS der 4,0 M-Extrakt einen höheren Anteil, der 8,0 M-Extrakt mit seinem Anteil von nur 1% an der Glucuronsäure entsprechend den niedrigsten.

Abb. 3

Der Einbau von ^3H -Glucosamin in drei lösliche und einen strukturgebundenen Proteoglycanpool.
Einbauraten bezogen auf Hexosamin

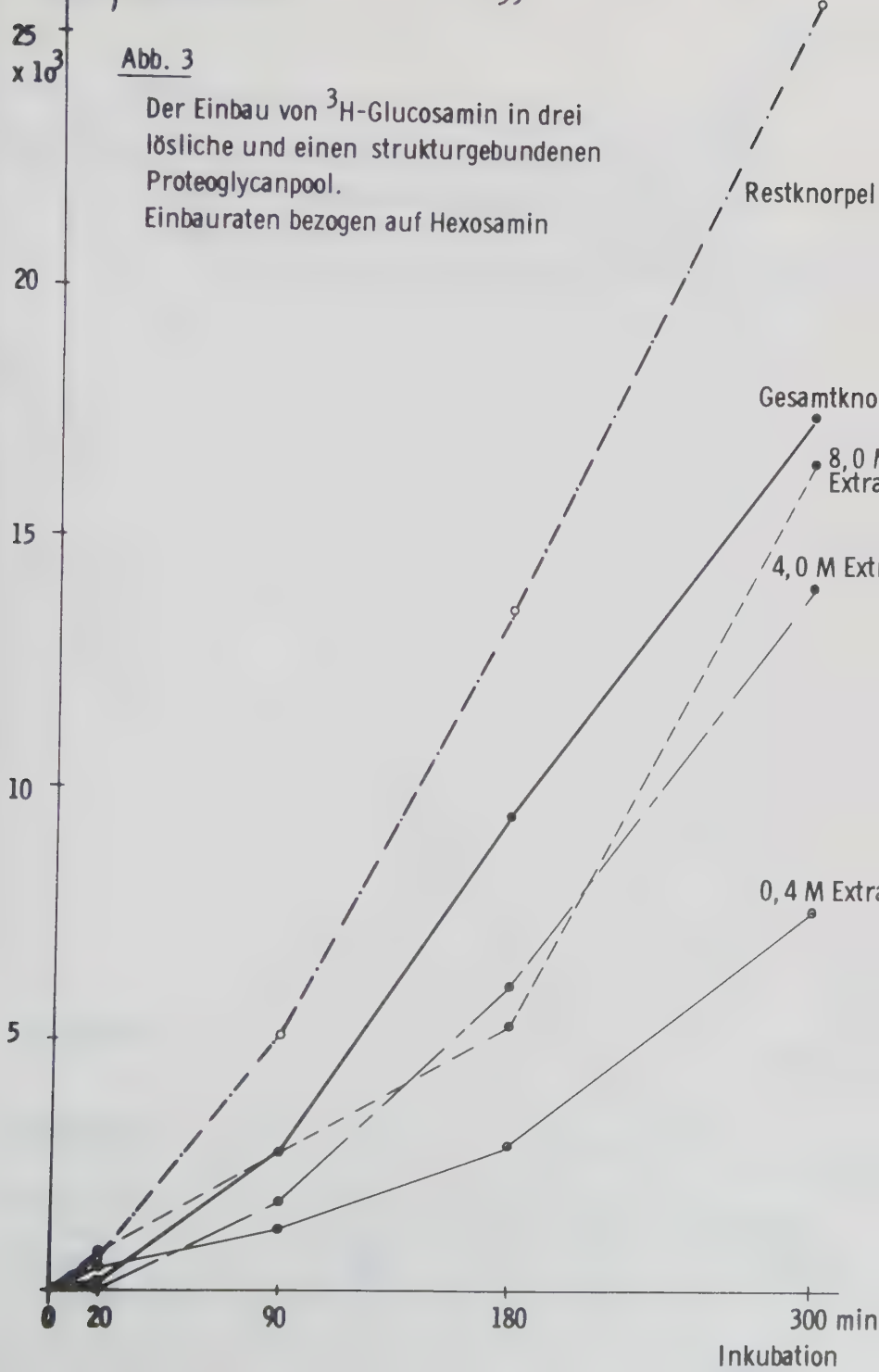


Abb. 4

Der Einbau von ^3H -Glucosamin in drei lösliche und einen strukturenbundenen Proteoglycanpool.

Einbauraten bezogen auf g Feuchtgewicht

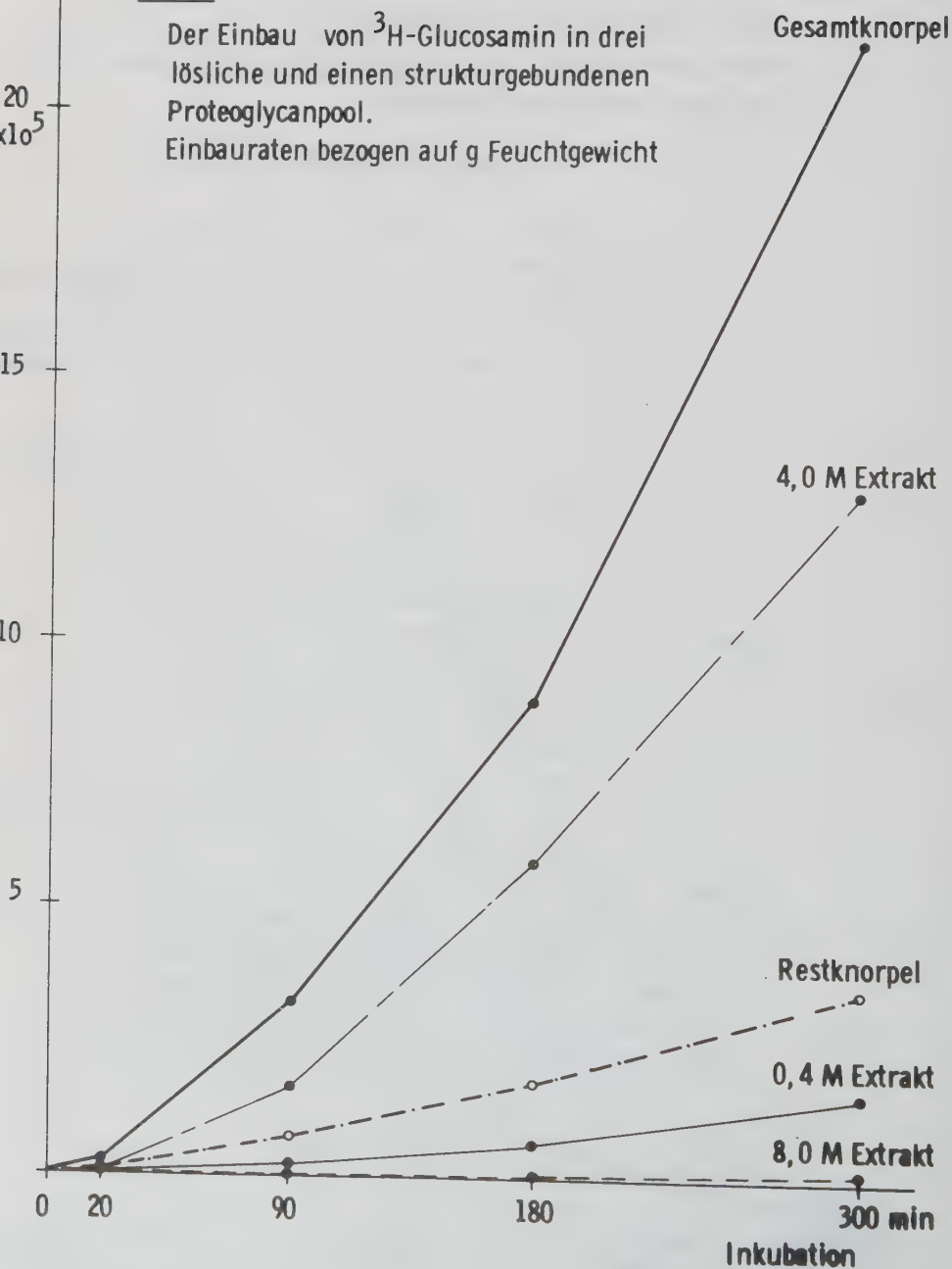


Abb. 5

Der Einbau von ^3H -Glucosamin in drei lösliche und einen strukturgebundenen Proteoglycanpool.

Einbauraten bezogen auf mg DNS

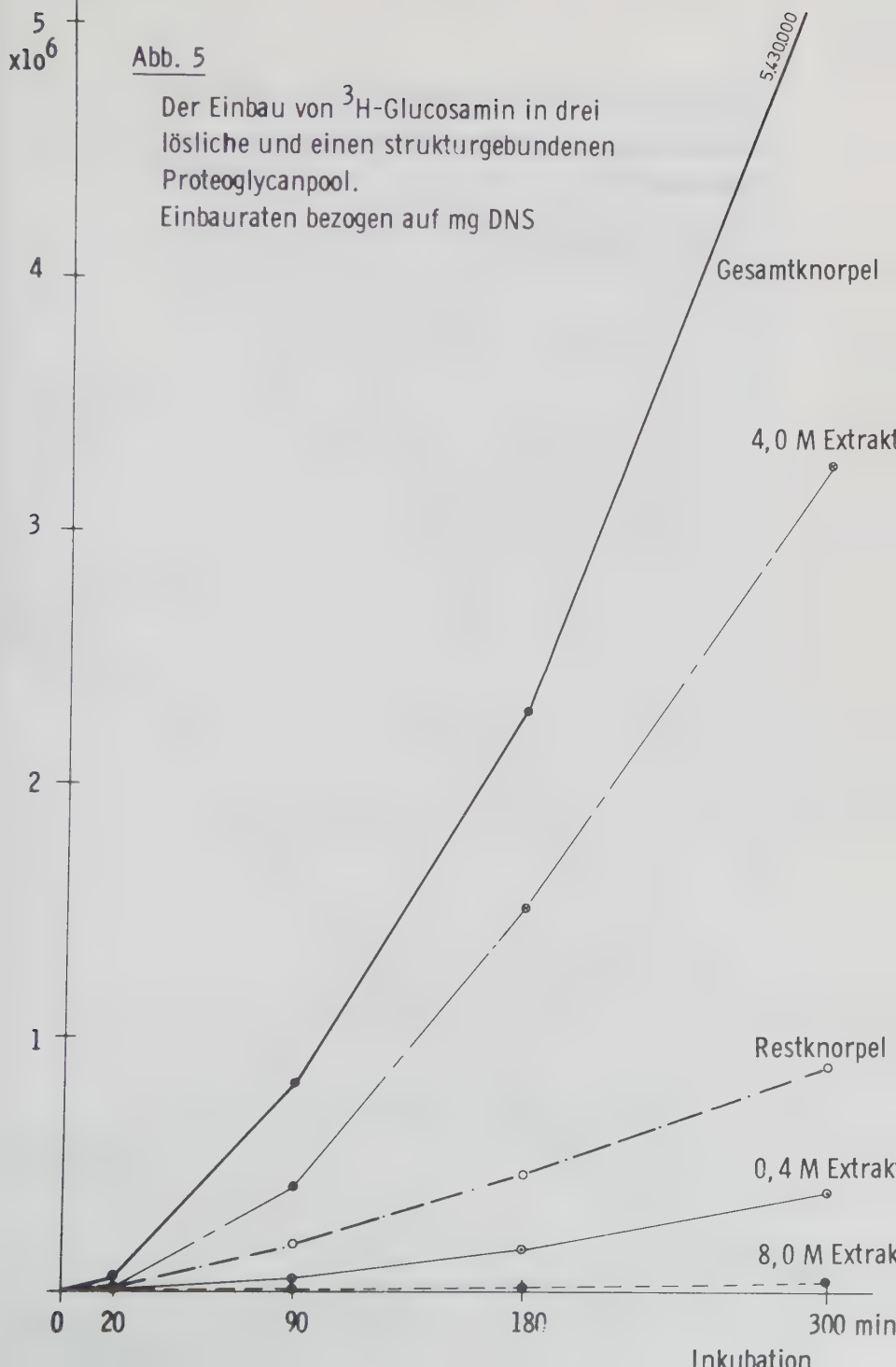
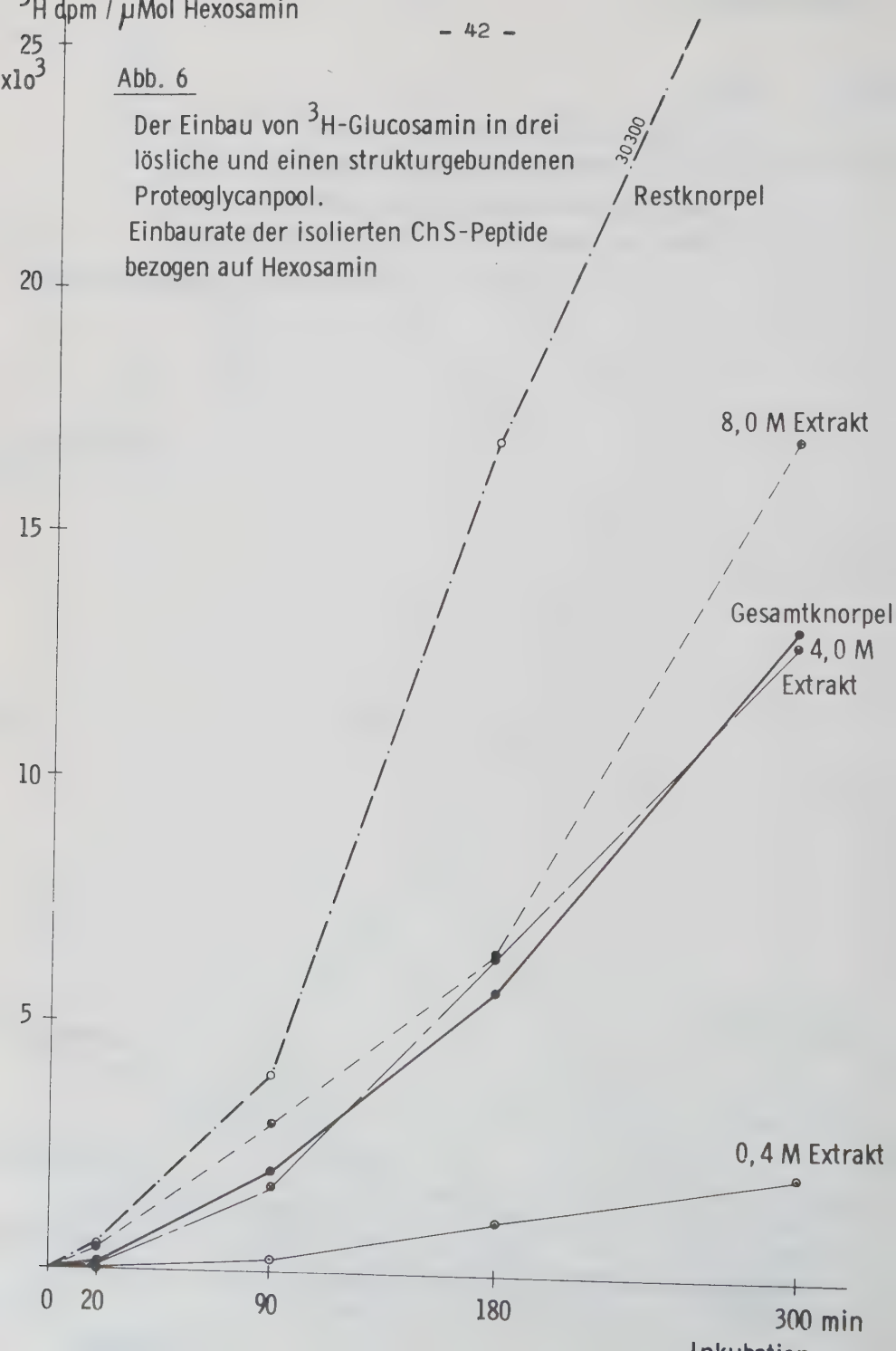


Abb. 6

Der Einbau von ^3H -Glucosamin in drei lösliche und einen strukturgebundenen Proteoglycanpool.
Einbauraten der isolierten ChS-Peptide bezogen auf Hexosamin



3.2.1.2. ISOLIERTES UND GEREINIGTES MATERIAL

Den höchsten Anteil an neusynthetisiertem Material findet man auch hier im Restknorpel. (Abb.6); diese isolierten und gereinigten ChS-Peptide sind über die gesamte Versuchszeit am höchsten spezifisch markiert. Der 4,0 M-Extrakt hat etwa die gleiche spezifische Aktivität wie der Gesamtknorpel, der 0,4 M-Extrakt ist deutlich weniger stark markiert, der 8,0 M-Extrakt zeigt höhere spezifische Radioaktivität als der Gesamtknorpel. Wie im Dialysat erweist sich auch hier das neusynthetisierte Material gegen die Extraktion mit GuaHCl deutlich widerstandsfähiger als das ältere, nicht markierte. Auch hier steigt die Einbaurate des radioaktiven Hexosamins in die ChS-Ketten über die gesamte Versuchszeit ständig an, besonders ab der 90. Minute.

Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, daß der spezifisch höchstmarkierte Restknorpel einen strukturgebundenen "Primer"-Pool an Chondroitinsulfat-Proteinen darstellt, der lösliches ^3H -Glucosamin-markiertes Material an verschiedenen lösliche Pools kontinuierlich abgibt.

3.2.2. DER EINBAU VON SULFATESTERN

3.2.2.1. DIALYSIERTE EXTRAKTE

Der Einbau von Sulfatestern steigt bis zu 180 min fast linear an, danach nehmen die Werte der spezifischen Aktivitäten ab, und zwar für alle

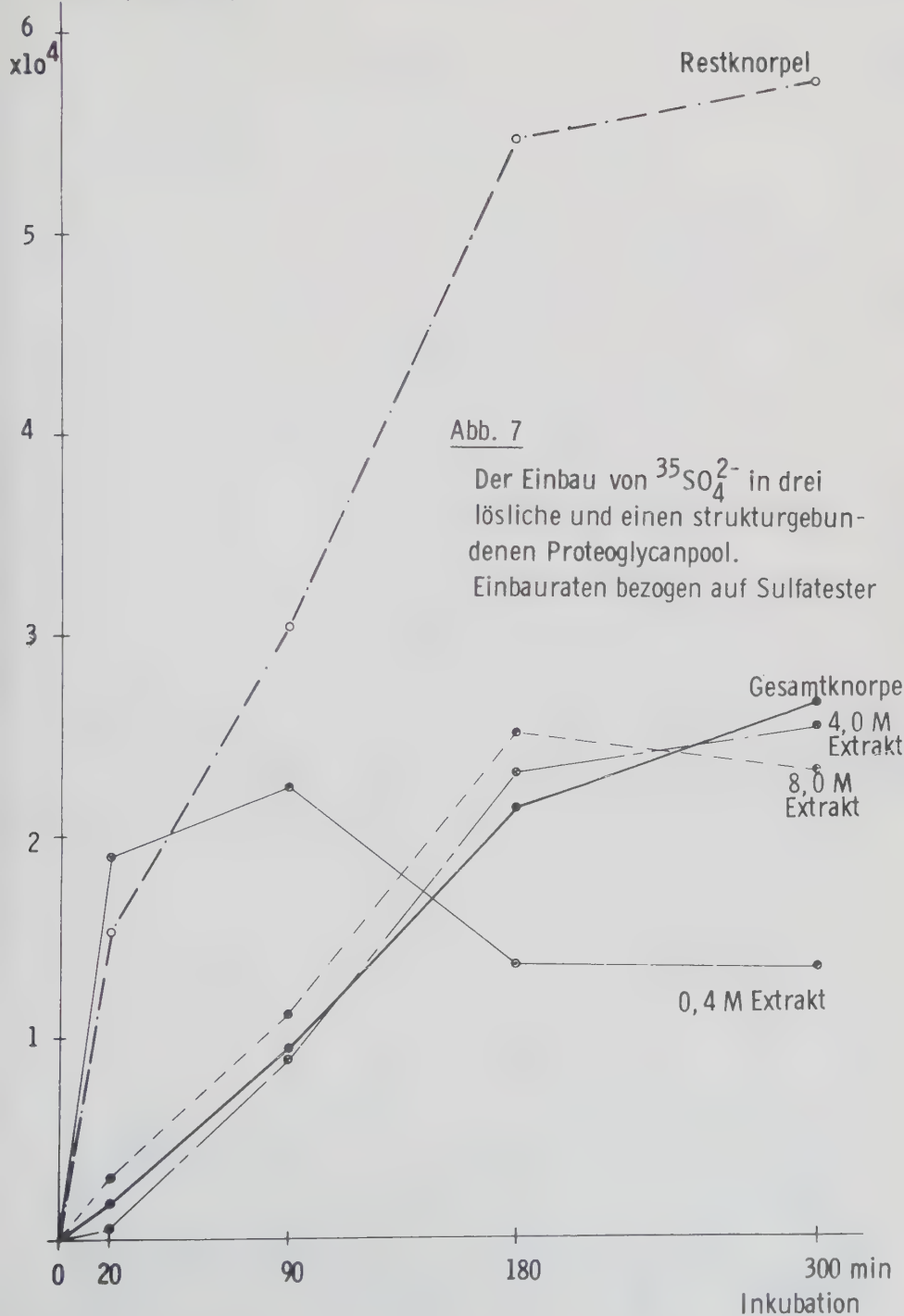
Fraktionen, was eine verminderte Synthesekapazität der Knorpelzellen anzeigt, obwohl die anaerobe Glycolyserate zwischen der 180. und 300. min weiterhin linear ansteigt. Offenbar ist die Konzentration an radioaktivem Sulfat im Ansatz zu gering gewesen (Abb. 7). Den höchsten Anteil am neusynthetisierten Material hat der Restknorpel, den geringsten Anteil der 0,4 M-Extrakt. Die spezifische Aktivität der 4,0 und 8,0 M-Extrakte ist in etwa so hoch wie im Gesamtknorpel.

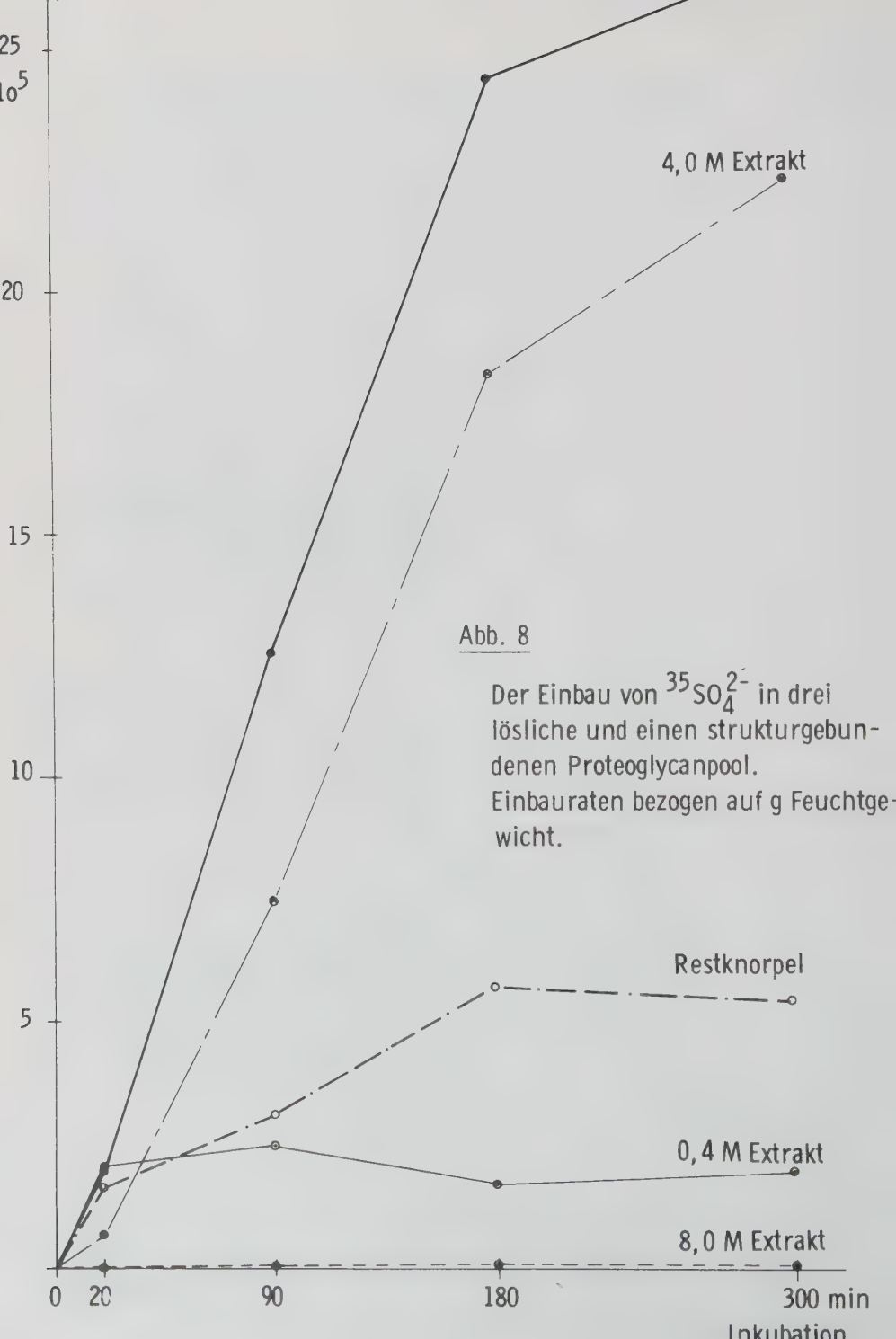
Auffällig ist der 0,4 M-Extrakt bei Inkubation nach 20 min und 90 min, wo eine höhere spezifische Aktivität als in allen anderen Extrakten vorliegt. Stellt man die Bilanz für die absoluten Mengen eingebauten radioaktiven Sulfats auf (bezogen auf 1 g Feuchtgewicht - Abb. 8, - oder 1 mg DNS - Abb. 9 -), so liegt zumindest für 20 min Inkubation die Summe aus Extrakten plus Restknorpel-Werten höher als im Gesamtknorpel. Das legt die Vermutung nahe, daß freie Sulfationen in den Materialien sind, die durch Dialyse nicht entfernt werden können, z.B. im 0,4 M-Extrakt (vgl. Methodenkritik 3.1.1.2.).

Bei der Betrachtung der radioaktiven Sulfatester, auf 1 g Fg (Abb. 8) bzw. DNS-Gehalt bezogen (Abb. 9), zeigt sich der fast lineare Einbau bis zu 3 Stunden, dann ein geringerer Einbau. Entsprechend des hohen Glucuronsäure-Gehalts liegt hier der 4,0 M-Extrakt anteilmäßig am höchsten, die anderen Extrakte haben gemäß ihres GlcS-Anteils weniger Radioaktivität.

^{35}S dpm / $\mu\text{Mol SO}_4^{2-}$

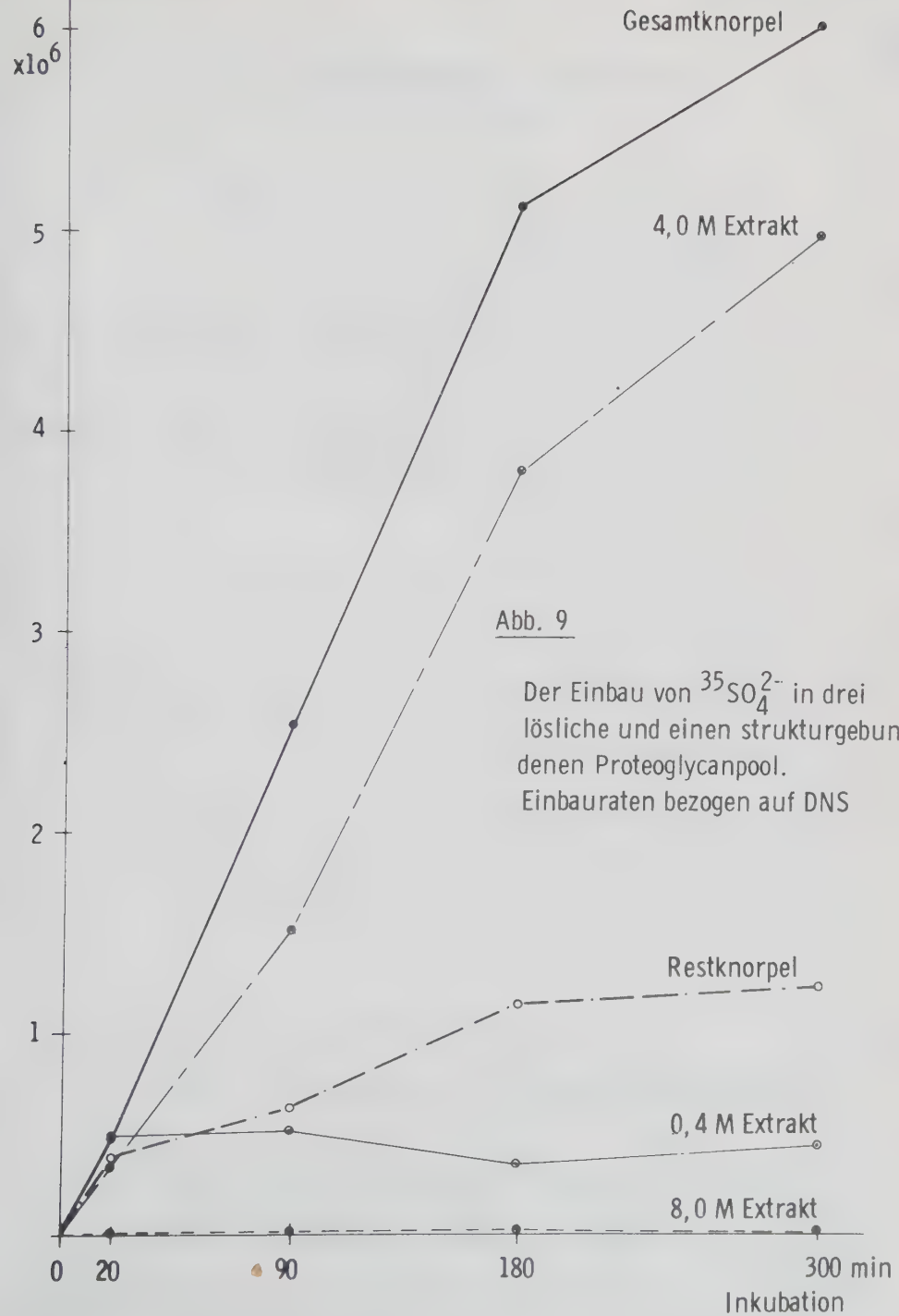
- 45 -

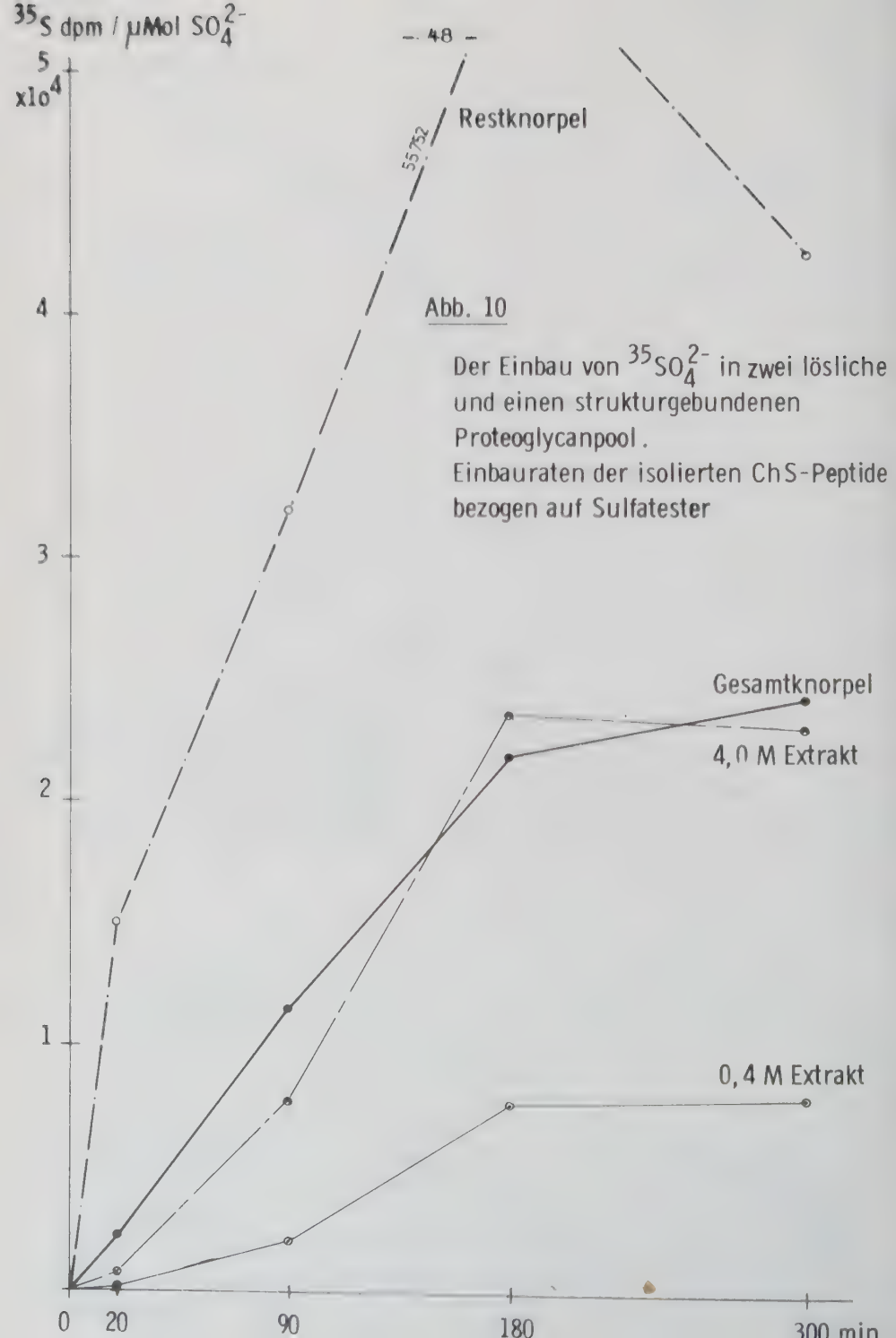




^{35}S dpm / mg DNS

- 47 -





3.2.2.2. DIE EINBAURATEN IM ISOLierten UND GEREINIGTEN MATERIAL

Der Anteil des neusynthetisierten Materials an den ChS-Peptiden steigt bis zu 180 min stetig an, danach weniger, oder fällt im Restknorpel sogar ab (Abb. 10). Die ChS-Peptide des Restknorpels haben den höchsten Anteil an neusynthetisiertem Material, der 0,4 M-Extrakt liegt mit seinem Anteil an radioaktiven Sulfatestern am niedrigsten. Der 4,0 M-Extrakt ist etwa so stark markiert wie der Gesamtknorpel.

Werden die Einbautraten auf g Fg bezogen, so ergeben sich ähnliche Verhältnisse (Abb. 11).

Der 4,0 M-Extrakt weist die höchsten Beträge auf, die Bilanzen liegen in Bezug auf die Gesamtknorpelwerte auch für die 20-Minuten-Inkubation unter 100%. Die ChS-Peptide zeigen also ebenfalls die Tendenz, sich als neusynthetisiertes Material (d.h. nach Sulfatierung) der Extraktion stärker zu widersetzen und erst unter härteren Versuchsbedingungen in Lösung zu gehen.

Auch die Ergebnisse des Einbauversuches mit $^{35}\text{SC}_4^{2-}$ indizieren einen strukturgetundenen "Primer"-Pool, der markiertes lösliches Material an verschiedene Pools mehr oder weniger kontinuierlich abgibt.

3.2.3. DER EINBAU VON PROLIN

3.2.3.1. DIE EINBAURATEN IN DIALYSIERTEN EXTRAKTEN

Der Anteil des radioaktiv markierten Prolins steigt über die gesamte Versuchszeit stetig, fast linear an. Die spezifische Aktivität des Restknorpels ist

^{35}S dpm / g FG

- 50 -

$\times 10^{-5}$

20

15

10

5

0

0

20

90

180

300 min

Inkubation

Gesamtknorpel

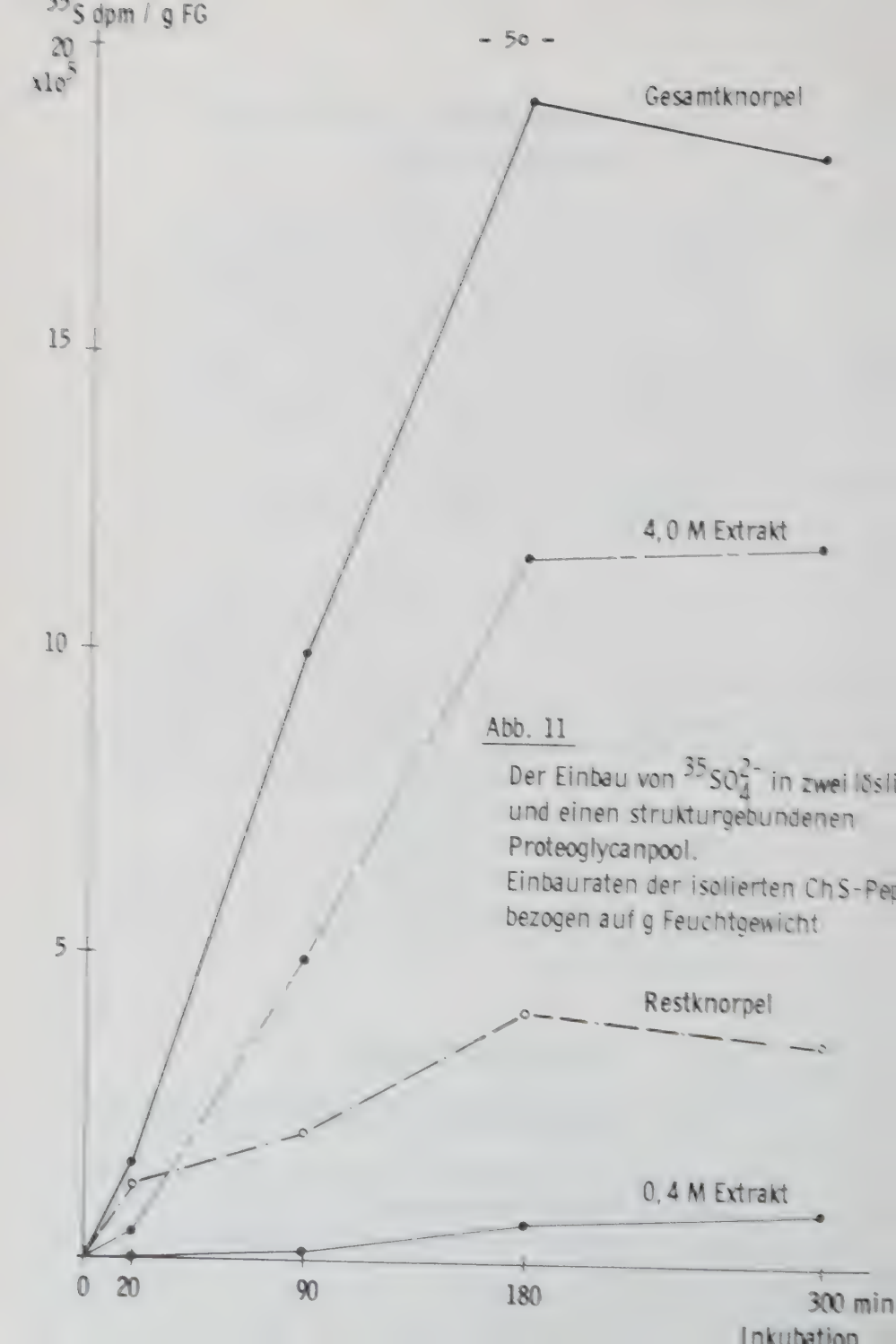
4,0 M Extrakt

Restknorpel

0,4 M Extrakt

Abb. 11

Der Einbau von $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ in zwei lösli-
und einen strukturebenen
Proteoglycanpool.
Einbausraten der isolierten ChS-Pep-
bezogen auf g Feuchtgewicht



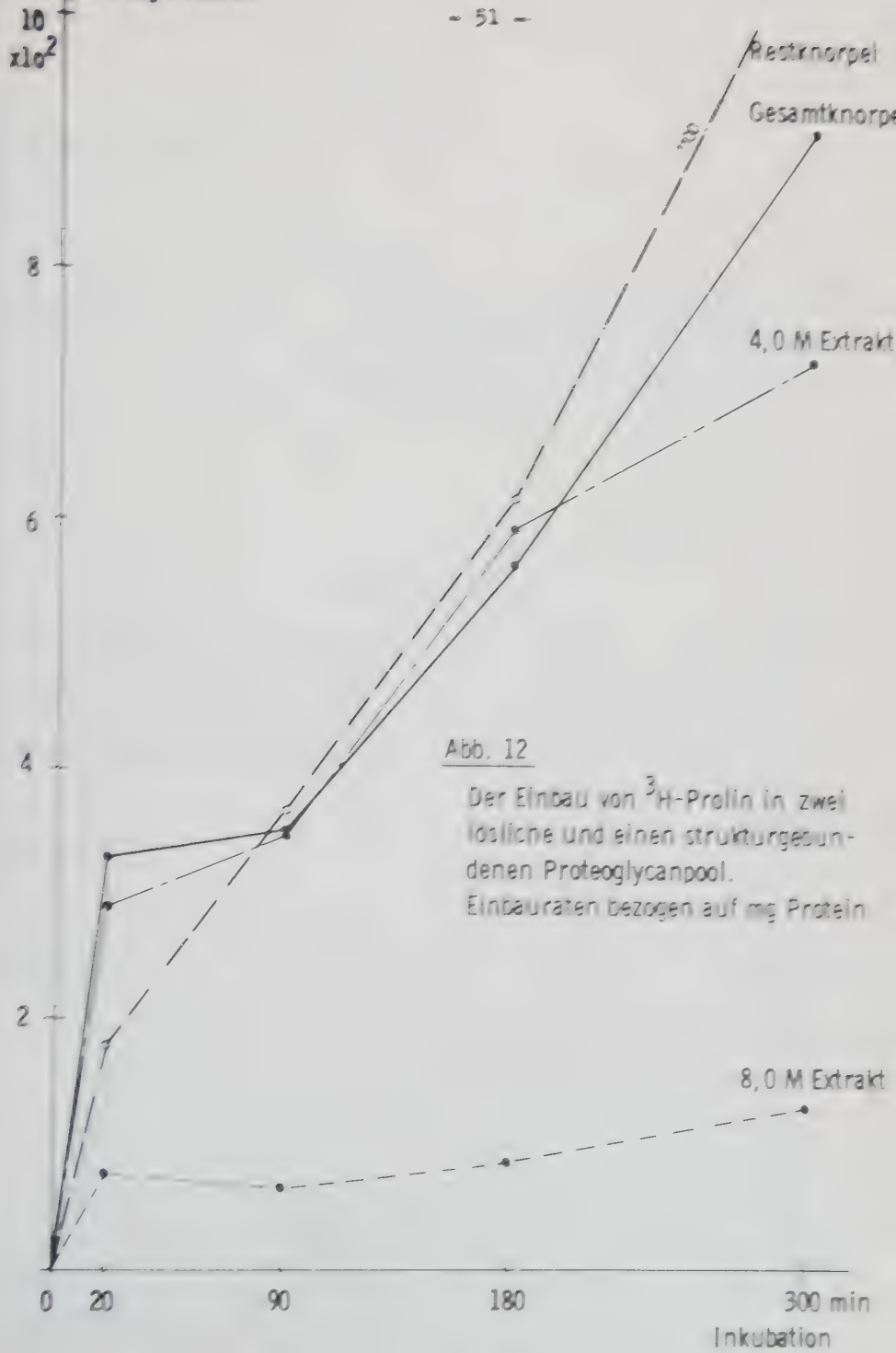


Abb. 12

Der Einbau von ^3H -Prolin in zwei lösliche und einen strukturgebundenen Proteoglycanpool.
Einbauraten bezogen auf mg Protein

^3H dpm / g FG

- 52 -

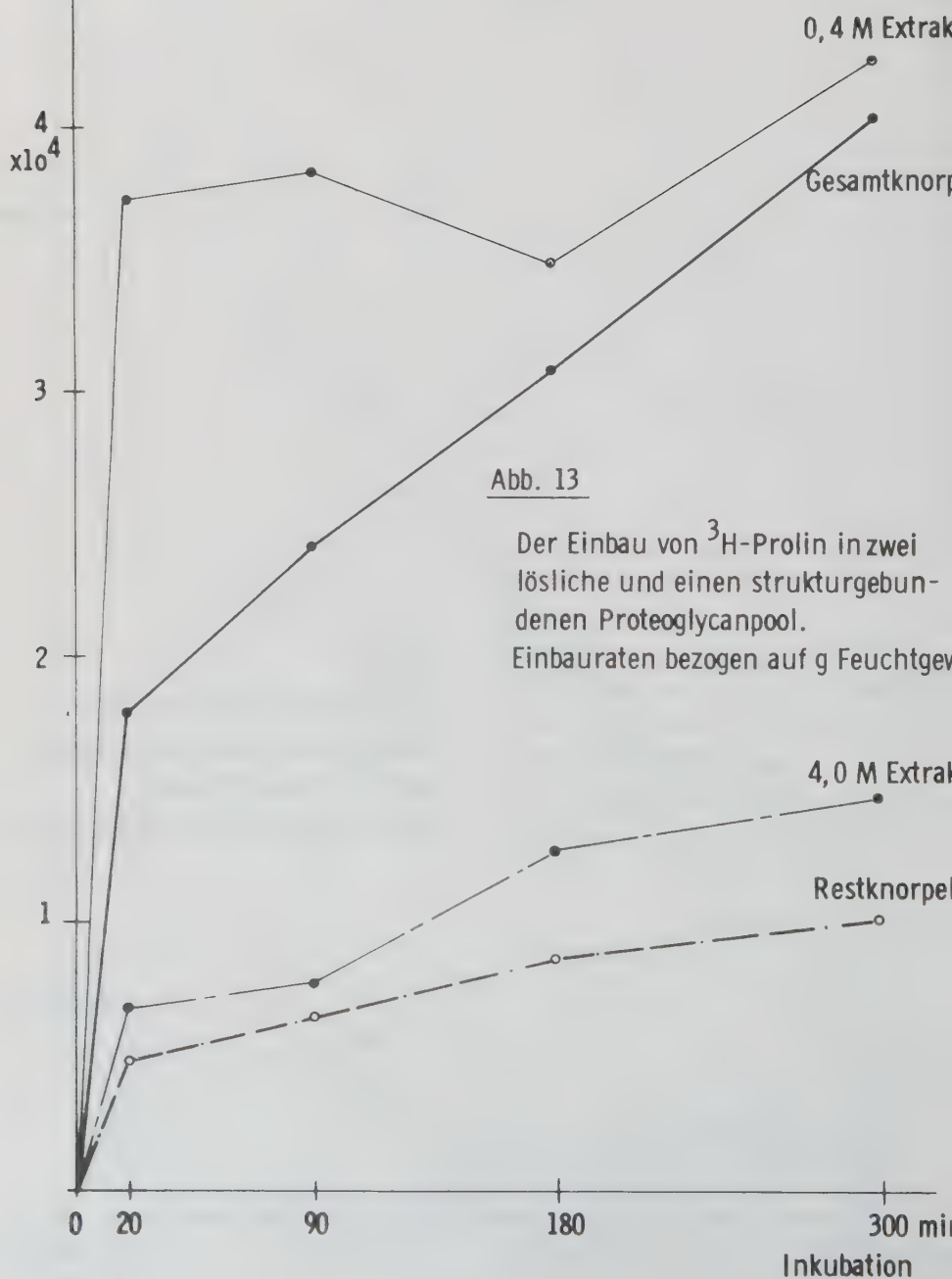


Abb. 13

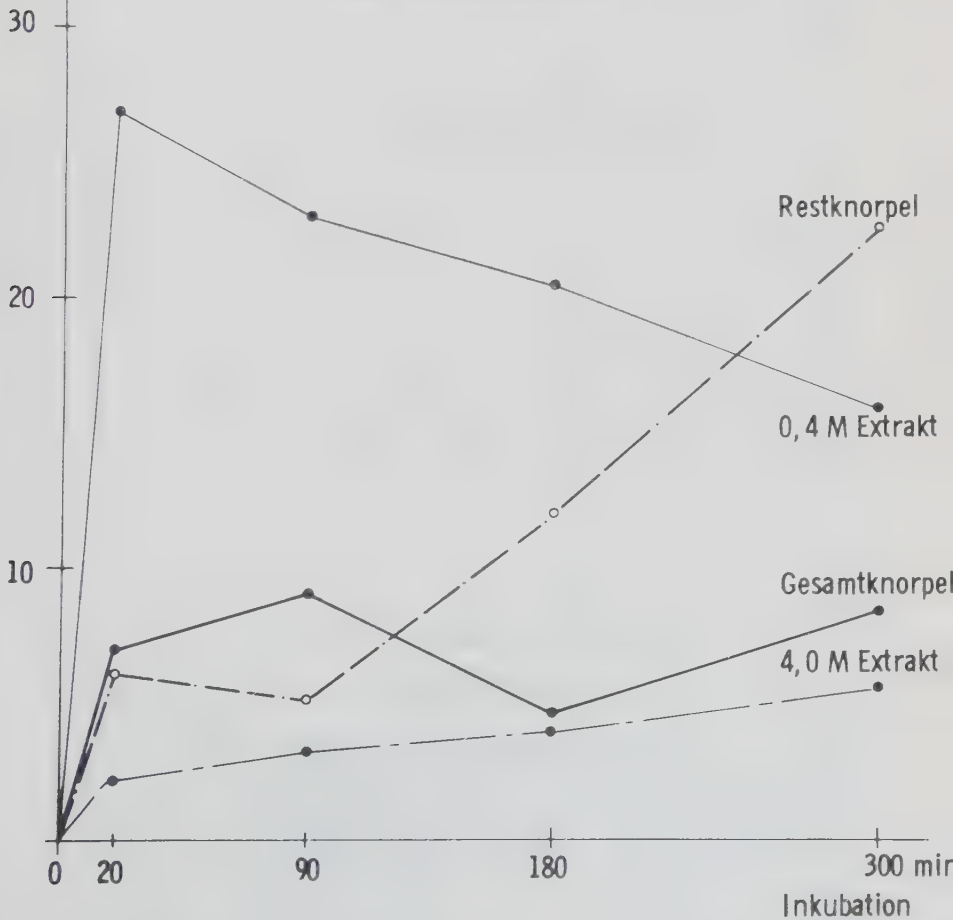
Der Einbau von ^3H -Prolin in zwei lösliche und einen strukturegebundenen Proteoglycanpool. Einbauraten bezogen auf g Feuchtgew.

^3H dpm / μMol GlcS

Abb. 14

Der Einbau von ^3H -Prolin in zwei lösliche und einen strukturebundenen Proteoglycanpool.

Einbauraten der isolierten ChS-Peptide bezogen auf Glucuronsäure



wieder am höchsten, mit Ausnahme der 20-min-Werte, wo die Werte im Gesamtknorpel und im 4,0 M-Extrakt etwas höher liegen. Nur der 8,0 M-Extrakt enthält deutlich weniger neusynthetisiertes Material. (Abb.12)

Der 0,4 M-Extrakt besaß im Dialysat zuviel nichtdialysierbares radioaktives Prolin, so daß eine Beurteilung nicht möglich ist; bei Betrachtung der absoluten Einbauraten, bezogen auf 1 g Feuchtgewicht, fallen alle Werte des 0,4 M-Extraktes deutlich aus der Bilanz heraus (Abb.13).

3.2.3.2. DIE EINBAURATEN DES PROLIN IM ISOLIERTEN UND GEREINIGTEN MATERIAL

Der Einbau von ^3H -Prolin in die ChS-Peptide des Gesamtknorpels nimmt nach der 90. Inkubationsminute nicht mehr zu (Abb.14), wohl aber derjenige im Restknorpel und im 4,0 M-Extrakt bei einer gleichzeitigen stetigen Abnahme von Aktivität aus dem 0,4 M-Extrakt. Diese Befunde weisen auf einen Einbau von markiertem Material in unlöslicheres hin.

3.2.4. "PULSE-CHASE"-VERSUCHE (Tab.9)

3.2.4.1. DER EINBAU VON HEXOSAMIN

Durch die weitere 280-minütige Inkubation ohne Radioaktivität stieg der Anteil des radioaktiven Glucosamins noch auf etwa das Dreifache an; durch die Waschung nach der radioaktiven Inkubation

	Dialysiertes Material				isoliertes und gereinigtes Material			
	^3H -dpm / μMol Hexosamin				^3H -dpm / μMol Hexosamin			
	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs (%)	300 min	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs (%)	300 min
Gesamtknorpel	174	521	299	17 450	133	398	299	13 030
0,4 M-Extrakt	493	852	173	4 585	9	148	1611	2 030
4,0 M-Extrakt	50	378	756	14 050	23	360	1565	12 800
8,0 M-Extrakt	786	831	106	16 500	448	694	155	16 900
Restknorpel	630	775	123	28 650	480	938	195	30 300
	Dialysiertes Material				isoliertes und gereinigtes Material			
	^3H -dpm / 1 g Fg				^3H - dpm / 1 g Fg			
	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs (%)	300 min	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs (%)	300 min
Gesamtknorpel	22 600	60 000	265	2 117 000	15 200	36 400	239	1 280 000
0,4 M-Extrakt	7 070	9 770	138	154 000	400	2 300	575	84 000
4,0 M-Extrakt	4 575	40 100	872	1 275 000	1 700	23 100	1712	1 015 000
8,0 M-Extrakt	610	900	150	16 000	- nicht bestimmt			
Restknorpel	7 740	9 750	127	346 000	6 700	14 500	216	304 000

Tab.: 2 Radiobiochemische Markierung des Kälberknorpels und seiner Extrakte nach "Pulse-Chase" (^3H -Glucosamin).

wurde offenbar nicht alles freie Material entfernt, so daß noch ein weiterer Einbau erfolgen konnte. Die Werte liegen ca. 30-fach unter denen, die sich nach 300 min radioaktiver Inkubation ergaben. Das so eingebaute Material ließ sich offenbar vor allem durch die 4,0 M-Extraktion in Lösung bringen, und zwar auf Kosten der 0,4 und 8,0 M-Extrakte und besonders des Restknorpels; während der längeren Nachinkubation ging das neusynthetisierte Material also in den 4,0 M-Extrakt ein, d.h. das im Nachhinein markierte Material des strukturgebundenen "Primer"-Pools läßt sich hauptsächlich mit 4,0 M, weniger mit 0,4 M-Lösungen von Guanidiniumchlorid lösen.

Bei den isolierten und gereinigten Peptiden ergeben sich ähnliche Verhältnisse (Tab. 9).

3.2.4.2. DER EINBAU VON SULFATESTERN (Tab. 10)

Nach dem "Pulse-Chase" mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ blieb die Gesamteinbaurate bezogen auf $\mu\text{Mol SO}_4^{2-}$ bzw. 1 g Feuchtgewicht in der Nachinkubationsperiode nahezu konstant (Tab. 10); jedoch wurde offensichtlich neusynthetisiertes Material des strukturgebundenen "Primer"-Pools an lösliche Pools (0,4 M und 4,0 M-Extrakt) abgegeben. Auch hier war die leichtere Extrahierbarkeit nach längerer Inkubation erkennbar.

Die Bilanzierungsberechnungen zeigen, dass sich in den Extrakten sehr wahrscheinlich noch freie Radioaktivität befindet, die erst nach Isolierung der ChS-Peptide eliminiert werden kann.

	Dialysiertes Material ^{35}S -dpm/ $\mu\text{Mol SO}_4^{--}$				Isoliertes und gereinigtes Material ^{35}S -dpm/ $\mu\text{Mol SO}_4^{--}$			
	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs(%) (Verlust)	300 min	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs (%) (Verlust)	300 min
Gesamtknorpel	1850	1710	-11	26 600	2285	2250	- 2	24352
0,4 M-Extrakt	19 000	45265	238	13 300	155	764	493	7990
4,0 M-Extrakt	660	1639	243	25 400	711	1536	216	23166
8,0 M-Extrakt	2820	1992	- 29	14 700	-	nicht bestimmt	-	
Restknorpel	15280	3937	- 75	57 700	15120	45333	300	42520
	Dialysiertes Material ^{35}S -dpm / 1g Fg				Isoliertes und gereinigtes Material ^{35}S -dpm / 1g Fg			
	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs(%) (Verlust)	300 min	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs (%) (Verlust)	300 min
Gesamtknorpel	198000	180 000	- 9	2 685 000	156 000	139100	- 11	1 809 000
0,4 M-Extrakt	207000	430 000	208	195 000	890	3950	444	88 260
4,0 M-Extrakt	65500	160 400	242	2 215 000	44 400	110600	249	1 167 000
8,0 M-Extrakt	920	600	- 33	5 650	-	nicht bestimmt	-	
Restknorpel	163700	36 670	- 77	541 200	120 800	28600	- 76	359 000

Tab. 10: Radiobiochemische Markierung des Kälberknorpels und seiner Extrakte nach "Pulse-Chase" ($^{35}\text{SO}_4^{--}$).

	Dialysiertes Material ^3H -dpm / mg Protein			isoliertes und gereinigtes ^3H -dpm / $\mu\text{Mol Glcs}$		
	20 min	Pulse-Chase	Verlust (%)	300 min	20 min	Pulse-Chase Zuwachs- (Verlust) (%)
Gesamtknorpel	330	183	- 45	916	7	4
0,4 M-Extrakt	2920	226	- 92	3160	27	10
4,0 M-Extrakt	291	102	- 65	733	2	2
8,0 M-Extrakt	77	56	- 27	130	- nicht bestimmt	-
Restknorpel	180	145	- 19	1098	6	11
						183
						23
	Dialysiertes Material ^3H -dpm / 1g Fg			isoliertes und gereinigtes ^3H -dpm / 1g Fg		
	20 min	Pulse-Chase	Zuwachs (%) (Verlust)	300 min	20 min	Pulse-Chase Zuwachs- (Verlust) (%)
Gesamtknorpel	17 900	6310	- 65	40 100	867	504
0,4 M-Extrakt	37 300	1730	- 95	42 300	328	99
4,0 M-Extrakt	6 830	2240	- 67	14 600	213	155
8,0 M-Extrakt	120	126	105	197	- nicht bestimmt	-
Restknorpel	4 814	4580	- 5	10 100	70	82
						117
						217

Tab. 11: Radiobiochemische Markierung des Kälberknorpels und seiner Extrakte nach "Pulse-Chase" (^3H -Prolin).

3.2.4.3. DER EINBAU VON PROLIN (Tab. 11)

Beim Prolin-Ansatz war im Gesamtknorpel nach der "Pulse"-Chase-Inkubation weniger radioaktives Prolin enthalten als bei den nach 20 min beendeten Versuchen, der Anteil lag im 0,4 M-Extrakt deutlich niedriger, ebenso im 4,0 M-Extrakt. Im 8,0 M-Extrakt blieb der Anteil etwa konstant, wohingegen er im Restknorpel leicht abnahm. (Tab.11) Bezogen auf 1 g Feuchtwicht ergaben sich vergleichbare Einbauraten.

Aus diesem Versuch waren keine eindeutigen Ergebnisse zu entnehmen, da offensichtlich ein Verlust von neusynthetisiertem Material aus dem 0,4 M-Extrakt beim Ansetzen der Nachinkubation stattgefunden hat und, -wie Bilanzberechnungen zeigen-, in den einzelnen Fraktionen noch freies ³H-Prolin vorhanden ist.

4. DISKUSSION

Eine physikalisch-chemische und metabolische Heterogenität der Proteoglycane verschiedener Knorpelgewebe ist bereits in-vivo und in-vitro Untersuchungen beschrieben worden: Für Kaninchen- (Davidson und Small, 1963; Katsura und Davidson, 1966), Ratten- (Campo et al., 1972), Meerschweinchen- (Lohmander et al., 1973) und Kälberrippen (Kleine und Hilz, 1968, 1970; Kleine et al., 1968, 1971; Kleine 1972); für Rindernasenknoorpel (Kresse und Buddecke, 1968), für Ohrenknorpel vom Kaninchen (Bentley und Rokosová, 1970; Rokosová und Bentley, 1972, 1973), für Larynx-Knoorpel vom Schwein (Hardingham und Muir, 1970; 1972). Wurde hierbei die Markierungsrate der strukturgebundenen (unlöslichen) Proteoglycane gemessen, so zeigten sich stets niedrigere Werte als in den löslichen Proteoglycanfraktionen.

Die in dieser Arbeit beschriebene physikalisch-chemische Heterogenität der Proteoglycane des Kälberrippenknorpels in Bezug auf Löslichkeit mittels Guanidinium-HCl und Sulfatierungsgrad entspricht weitgehend früheren Arbeiten (Kleine 1973 a, 1974). In dieser Arbeit wurden weiterhin aus den rohen Proteoglycanpools Chondroitensulfat-peptide isoliert, gereinigt und Sulfatierungsgrad und molares Hexosamin/ Glucuronsäure-Verhältnis ermittelt. Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, daß die mittlere Kettenlänge der ChS-Seitenketten der Proteoglycane des 0,4 M und 8,0 M-Extraktes kurz (10 - 18 Disaccharide), diejenige des 4,0 M-Extraktes länger (16 - 24 Disaccharide) und diejenige des unlöslichen Rück-

standes am längsten ist (12 - 27 Disaccharide) (Kleine 1973a, Kleine et al., 1974). Außerdem werden über 75% der Proteoglycane des unlöslichen Rückstandes mittels Collagenase-Behandlung gelöst und erweisen sich im Dichtegradienten heterogen (Kleine und Wunsch, 1975). Damit zeigen die Proteoglycane des Kälberrippenknorpels, die zum überwiegenden Anteil (über 90%) aus Chondroitinsulfat bestehen (Kleine und Hilz, 1968), eine beachtliche chemische Heterogenität auf, die mit einer metabolischen einhergeht.

Grundsätzlich läßt sich feststellen, daß die verabreichten Precursor $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ u. ^3H -Glucosamin (weniger ^3H -Prolin) die höchste spezifische Einbaurate in den Proteoglycanen des unlöslichen Rückstandes aufweisen und die niedrigste in denjenigen des 0,4 M-Extraktes. Die Einbauraten des 4,0 M- und 8,0 M-Extraktes liegen dazwischen. Diese Befunde bestätigen andere $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ -Einbauversuche mit Knorpelschnitten (Kleine 1973a, Kleine und Wunsch, 1975). Während diese Feststellung für ^3H -Glucosamin-markierte Proteoglycane und daraus isolierte Chondroitinsulfat-Peptide uneingeschränkt gilt, zeigen Bilanzierungen (Einbauraten bezogen auf g Feuchtwicht oder DNS), daß zumindest im dialysierten 0,4 M-Extrakt noch ungebundene Radioaktivität von $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ und ^3H -Prolin sich befindet, was in den jeweiligen isolierten Chondroitinsulfatpeptiden nicht mehr der Fall ist.

Diese Untersuchungen untermauern somit die früher aufgestellte These, daß die metabolisch und chemisch heterogenen unlöslichen Proteoglycane des Kälberrippenknorpels einen "Primer"-Pool neusynthetisierter Proteoglycane darstellen, der markiertes Material in

unterschiedlicher Weise an unterschiedlich lösliche Proteoglycanpools abgibt (Kleine 1973a, 1974; Kleine et al., 1974). Weiterführende Versuche haben außerdem gezeigt, daß der unlösliche strukturgebundene Proteoglycanpool zumindest nach $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ -Markierung mittels Collagenase-Behandlung in zwei weitere Pools aufgetrennt werden kann: einen löslichen niedrig-markierten und einen strukturgebundenen höchstmarkierten (Knorpelzellen) (Kleine und Wunsch, 1975).

Beim Einbauversuch mit ^3H -Prolin kann außerdem gezeigt werden, daß markiertes Material aus dem 0,4 M-Extrakt hauptsächlich in den strukturgebundenen Pool, weniger in den 4,0 M-Extrakt zwischen der 90. und 300. Inkubationsminute abwandert, wobei die Gesamteinbaurate nicht mehr ansteigt. Da unter den verwendeten anaeroben Versuchsbedingungen die Hydroxylierung von ^3H -Prolin weitgehend blockiert ist (Kleine, 1973b), und damit sehr wahrscheinlich auch die Collagenbiosynthese, dürften diese Befunde einen ersten Hinweis geben auf einen Transfer von Proteoglycanen des leichtlöslichen Pools in unlöslichere Pools. Weitere Untersuchungen müssen diesen Befund abklären.

Einen weiteren Beweis für die These eines "Primer"-Pools im Kälberrippenknorpel geben "Pulse-Chase"-Versuche mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ und ^3H -Glucosamin, die hauptsächlich einen Transfer von de-novo-synthetisierten Proteoglycanen aus dem strukturgebundenen, unlöslichen Pool in den 4,0 M-Extrakt anzeigen. Damit bestätigen und untermauern diese Versuche frühere Untersuchungen (Kleine 1974; Kleine et al., 1974).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die hier dargelegten Versuche weitere Beweise für die These eines strukturgebundenen "Primer"-Pools im Kälberrippenknorpel aufzeigen, welcher in unterschiedlicher Weise de-novo-synthetisiertes Material an verschiedenen löslichen Pools abgibt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Kälberrippenknorpel werden mittels Guanidinium-Lösungen ansteigender Konzentration (0,4; 4,0; 8,0 M) bei pH 5,8 und zunehmender Temperatur (0°, 25°, 60°C) drei lösliche Proteoglycanpools und ein unlöslicher, strukturgebundener Pool isoliert. Die Proteoglycane dieser Pools unterscheiden sich in

- a) ihrem Uronsäuregehalt (14, 78, 1, 14% der Summe),
- b) ihrem Aminosäuregehalt (14, 81, 1, 11%),
- c) ihrem Sulfatestergehalt (10, 83, 1, 12%),
- d) ihrem Proteingehalt (29, 48, 1, 19%),
- e) ihrem DNS-Gehalt (19, 20, 1, 56%).

Die aus den Pools isolierten und gereinigten Chondroitinsulfat-Peptide sind unterschiedlich sulfatiert. Nach Markierung mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$, ^3H -Glucosamin, (weniger mit ^3H -Prolin) für 20, 90, 180 und 300 min unter anaeroben Bedingungen weisen der strukturgebundene Pool die höchste und der 0,4 M-Extrakt die niedrigste spezifische Markierungsrate auf, diejenige des 4,0 und 8,0 M-Extraktes liegt dazwischen. Bilanzberechnungen (Einbauraten bezogen auf g Feuchtgewicht oder DNS) demonstrieren, daß nach intensiver Dialyse zumindest im 0,4 M-Extrakt noch freie Radioaktivität von $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ und besonders von ^3H -Prolin enthalten ist, die erst nach Isolierung der Chondroitinsulfat-peptide entfernt werden kann.

Sowohl die Gesamteinbauraten als auch diejenigen der dialysierten Extrakte weisen lineare Zuwachsraten erst nach 90 min Inkubation oder später nach Markierung mit ^3H -Glucosamin auf. Die Einbauraten beim Sulfateinbau nehmen nach 20 min Inkubation linear zu, jedoch zwischen 180 und 300 min ab, obwohl bei allen Versuchen die anaerobe Glycolyserate linear während

der gesamten Inkubationszeit ansteigt. Beim Einbau von ^3H -Prolin ist ein Transfer von neu markierten Chondroitinsulfatpeptiden aus dem relativ hoch markierten 0,4 M-Extrakt in die unlösliche Fraktion und in den 4,0 M-Extrakt nach längerer Inkubation wahrscheinlich, obwohl die Gesamteinbaurrate der ChS-Peptide nach 90 min Inkubation zum Stillstand kommt.

"Pulse-Chase"-Versuche mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ und ^3H -Glucosamin machen den Transfer von markiertem Material aus dem strukturgebundenen Proteoglycanpool in den 4,0 M-Extrakt und 0,4 M-Extrakt deutlich.

Diese Untersuchungen untermauern die für Kälberrippenknorpel früher aufgestellte These (Kleine 1973a, 1974; Kleine et al., 1974) eines strukturgebundenen

"Primer"-Pools mit höchstmarkierten Proteoglycanen, der in unterschiedlicher Weise verschieden lösliche Proteoglycanpools mit de-novo-synthetisiertem Material beschickt.

6. Literaturverzeichnis

- ANTONOPOULOS, C.A., S.GARDELL, J.A. SZIRMAI und ELLEN R. de TYSSONSK(1964): Determination for glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from tissue on the microgram scale. Biochim. biophys. Acta 83, 1-19
- BENTLEY, J.P. and B. ROKOSOVÁ (1970): The metabolic heterogeneity of rabbit ear cartilage chondroitin sulphate. Biochem. J. 116, 329-336
- BITTER, T. and H. MUIR (1962): A modified uronic acid carbazole reaction. Analyt. Biochem. 4, 330-334
- BOSTROM, H. (1952): Chondroitinsulphuric acid. J. biol. chem. 196, 477-481
- CAMPO, R.D., R.J. BIELEN and J. HETHERINGTON (1972): Metabolic studies on the protein-polysaccharides of cartilage. Biochim. biophys. Acta 261, 136-142
- DAVIDSON, E.A. and W. SMALL (1963): Metabolism in vivo of connective tissue mucopolysaccharides. Biochim. biophys. Acta 69, 459-463
- GROSS, I.J., M.B. MATHEWS and A. DORFMAN (1960): Sodium chondroitin-sulphate-protein-complexes of cartilage. J. biol. chem. 235, 2889-2892
- HARDINGHAM, T.E. and H. MUIR (1970): The effect of temperature on the biosynthesis of chondroitin-4-sulphate in cartilage slices in vitro. FEBS Lett. 2, 145-148

- HARDINGHAM, T.E. and H. MUIR (1972): Biosynthesis of proteoglycans in cartilage slices. Biochem. J. 126, 791-803
- KATSURA, N. and E.A. DAVIDSON (1966): Metabolism of connective tissue polysaccharides in vivo. Biochim. biophys. Acta 121, 135-142
- KLEINE, T.O. (1972): Struktur, Biosynthese und Heterogenität der Chondroitinsulfatproteine. Naturwissenschaften 59, 64-71
- KLEINE, T.O. (1973 a): Biosynthesis of chondroitin sulphate proteins. Isolation of four pools of chondroitin sulphate proteins differing in their solubility and labeling rates with radiosulphate in calf rib cartilage. FEBS Lett. 31, 170-174
- KLEINE, T.O. (1973 b): Differences in pool labeling during proteoglycan and collagen biosynthesis under anaerobic conditions in vitro. 9th Int. Congr. Biochem. Stockholm 1973. Abstract Ab 12 p. 424
- KLEINE, T.O. (1974): Biosynthesis of chondroitin sulphate proteins. Pulse labeling experiments with radiosulphate of four pools of chondroitin sulphate proteins in calf rib cartilage. FEBS Lett. 39, 255-258
- KLEINE, T.O. und H. HILZ (1968): Untersuchungen zur Biosynthese der Chondroitinsulfatproteine I: Charakterisierung der Protein-Polysaccharide aus Kälberrippenknorpel und ihre In-vitro-Markierung mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 349, 1027-1036

- KLEINE, T.O. und H. HILZ(1970): Metabolically different proteoglycans in calf rib cartilage. In: Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. (BALAZS, E.A. ed.) p.907-921, Vol. II Academic Press London.
- KLEINE, T.O., H.J. KIRSIG und H.HILZ (1968): Untersuchungen zur Biosynthese der Chondroitinsulfat-Proteine II: Über die Koordinierung von Protein-, Polysaccharid- und Sulfatester-Synthese im Rippenknorpel von Kälbern. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1037-1048
- KLEINE, T.O., H.J. KIRSIG und H.HILZ (1971): On the biosynthesis of chondroitin sulfate proteins III. Metabolic and chemical heterogeneity in calf rib cartilage as revealed by CsCl gradient centrifugation and CPC-cellulose chromatography. Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 352, 479-487
- KLEINE, T.O., J. WUNSCH, B. MERTEN, B. HEINRICH und S. HELLWIG (1974): Studies on the metabolic and chemical heterogeneity of calf rib proteoglycans. Connective Tissue 6, 67-84
- KLEINE, T.O. und J. WUNSCH (1975): Biosynthesis of chondroitin sulfate proteins. Isolation of an insoluble priming pool feeding one collagen bound and three soluble pools with heterogeneous proteoglycans. In: Proptides of the biological fluids. 22nd colloquium (PEETERS, H. ed.). Pergamon Press Oxford, pp.239-243

- ANFOSSE, H. und F. BUDDECKE (1968): Stoffwechselheterogenität von Chondroitin-4-Sulfat-Proteinen und Kollagenstoffwechsel in Rindernasenknorpel.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 349, 1497-1506
- LOHMANN, S., C.A. ANTONOPOULOS und U. FRIBERG (1973): Chemical and metabolic heterogeneity of chondroitin sulphate and keratan sulphate in guinea pig cartilage and nucleus pulposus.
Biochim. biophys. Acta 304, 430-448
- SKRABOVA, S. und J.F. BENTLEY (1972): The incorporation of ^{14}C -glucose into chondroitin sulfate of differing chain length.
Biochim. biophys. Acta 264, 98-102
- SKRABOVA, S. und J.F. BENTLEY (1973): The uptake of ^{14}C -glucose into rabbit ear cartilage proteoglycans isolated by differential extraction and by collagenase digestion.
Biochim. biophys. Acta 297, 473-485
- SCHILLER, S., M.B. MATHEWS, J.A. CITONELLI und A. NOFFMAN (1965): Metabolism of mucopolysaccharides in animals.
J. biol. chem. 218, 139
- SCHNEIDER, W.C. (1967) in: Methods in Enzymology (Colowick, S.P. und N.O. Kaplan, eds.) Vol. III, p. 680, Academic Press New York
- UMERFET, W., R.H. BURNIS und J.F. STAUFFER (1964): Manometric Techniques.
Burgess Publishing Company.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Amon, Aurich, Bernhardt, Castenholz, Dimroth,
Englhardt, Haan, Hennis, Hering, Heuser, Hort,
Hupe, Janke, Karlson, Keil, Kleine, Koch,
Koecke, Korb, Kühnel, Mahr, Mann, Niemeyer,
Nöth, Nultsch, Pantke, Petry, Pfütz, Riecken,
Rohen, Rosemann, Rupec, Schiff, Schmidt, Schnell,
Seidel, Siegert, Stuke, Vogt, Walcher, Zilliken.

LEBENS LAUF

Ich wurde als ältestes von drei Kindern des Zahnarztes Dr. Kurt Wunsch und seiner Ehefrau Marianne, geb. Scheper am 11.11.1945 in Wolfsburg geboren. Nach Besuch von 4 Jahren Volksschule und 9 Jahren Gymnasium legte ich am 25.2.1965 am Ratsgymnasium Wolfsburg - Naturwissenschaftlicher Zweig- die Reifeprüfung ab. Nach 1 Semester Mathematikstudium an der Philipps- Universität Marburg wurde ich zur Bundeswehr eingezogen und nahm nach Beendigung des 18-monatigen Grundwehrdienstes das Studium der Zahnheilkunde im Sommersemester 1967 an der Philipps- Universität Marburg auf. Am 11. Januar 1973 erhielt ich nach bestandenem Examen die Bestallung als Zahnarzt. Von Januar 1973 bis Juni 1974 arbeitete ich an den Experimenten zu vorliegender Dissertation, welche durch Mittel nach dem Graduiertenförderungsgesetz und eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt wurde. Seit Juli 1974 bin ich als zahnärztlicher Assistent in freier Praxis tätig. Meine Heimatanschrift lautet: 318 Wolfsburg, Albert-Schweitzer-Str. 8. Mein jetziger Wohnsitz ist 3340 Wolfenbüttel, Holzmarkt 17.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Kälberrippenknorpel. Isolierung und teilweise Charakterisierung dreier löslicher und eines unlöslichen strukturgebundenen "Primer-"Pools

im klinisch-chemischen Labor der Universitätsnervenklinik Marburg unter Leitung von Herrn Prof.Dr. Kleine ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Fachbereich Humanmedizin ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, 16.7.1976

Joachim Wunsch

